INDUKTION DES EISENCITRAT - TRANSPORTSYSTEMS VON ESCHERICHIA COLI K 12

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

LUITGARD ZIMMERMANN

aus Bensheim

~~1984~~

1983

UNIV.
LEUVEN
BIBL.

INDUKTION DES EISENCITRAT - TRANSPORTSYSTEMS VON ESCHERICHIA COLI K 12

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

LUITGARD ZIMMERMANN

aus Bensheim

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	20. Dezember 1983
Dekan:	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. K. Hantke

Gesamtherstellung: **aku**-Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Maria und Heinrich Zimmermann

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0019

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. V. Braun und Herrn Privatdozent Dr. K. Hantke am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und die vielen wichtigen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. V. Braun und Herrn Privatdozent Dr. K. Hantke sehr danken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern von Mikrobiologie I und II, die mir bei der Lösung vieler technischer und organisatorischer Probleme geholfen haben.

Besonders möchte ich Karin Maschke und Helga Wolff für die Durchführung der phototechnischen Arbeiten danken.

Renate Burkardt, Fredy Engelbrecht, Lothar Fecker und Roy Gross danke ich für die vielen Anregungen, die sich in Gesprächen mit ihnen ergaben.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1.	Chemikalien	11
2.2.	Nährmedien und Puffer	12
2.3.	Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen	14
2.3.1.	Bakterienstämme	14
2.3.2.	Eigenschaften von Mutanten, die während der Arbeit isoliert und charakterisiert wurden	15
2.4.	Kulturbedingungen	17
2.4.1.	Aerobes Wachstum	17
2.4.2.	Anaerobes Wachstum	17
2.5.	Streptonigrinversuche	17
2.5.1.	Bestimmung der Überlebendkeimzahl nach Streptonigrineinwirkung	17
2.5.2.	Streptonigrinselektion von Mutanten im Eisencitrat-Transportsystem	18
2.6.	Cycloserinanreicherung	18
2.6.1.	Cycloserinanreicherung von Mutanten im Eisencitrat-Transportsystem	18
2.6.2.	Cycloserinanreicherung von Mutanten mit reduzierter ß-Galactosidase-expression	19
2.7.	P1-Transduktion	19
2.7.1.	Herstellung eines P1-Plattenlysats	19
2.7.2.	Generelle P1-Transduktion	20
2.7.3.	Übertragung verschiedener Mutationen durch P1-Transduktion	20
2.7.3.1.	Übertragung der *recA* Mutation	21
2.7.3.2.	Übertragung der *tonB* Mutation	21
2.7.3.3.	Übertragung der *exbB* Mutation	21
2.7.3.4.	Übertragung der *fecB*::Mud1(Ap,*lac*) Mutation	21
2.8.	Isolierung von *fhuA* Mutanten	21
2.9.	Querstrichtest	22
2.10.	Mutagenese mit dem Phagen Mud1(Ap,*lac*)	22

		Seite
2.10.1.	Herstellung eines Mud1(Ap,lac)-Phagenlysats	22
2.10.2.	Isolierung von Mutanten, die den Phagen Mud1(Ap,lac) lysogen enthalten	23
2.11.	Testplatten für ß-Galactosidase-Aktivität	23
2.12.	Messung der ß-Galactosidase-Aktivität	23
2.13.	Mutagenese mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)	25
2.14.	Isolierung von lac::Tn5 bzw. lac::Tn10 Mutanten	25
2.15.	Schnellmethode zur Isolierung der äußeren Membran von E.coli	26
2.16.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.17.	Isolierung periplasmatischer Proteine	28
2.18.	Konjugationen	29
2.19.	Isolierung von P1arcF Cm-lysogenen Stämmen	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1.	Proteinmuster der äußeren Membran von E.coli K12 Mutanten	30
3.2.	Isolierung von Eisencitrat-Transportmutanten mit Hilfe von Streptonigrin	31
3.2.1.	Bestimmung der Überlebensrate verschiedener Eisencitrat-Transportmutanten nach Einwirkung von Streptonigrin	32
3.2.2.	Streptonigrinselektionsplatten für die Isolierung von Eisencitrat-Transportmutanten	33
3.2.3.	Isolierung von Eisencitrat-Transportmutanten mit Streptonigrin	33
3.3.	Mutationen, welche die Expression von fecB beeinflußen	36
3.4.	ß-Galactosidaseexpression des fecB Gens unter verschiedenen Kulturbedingungen. Einfluß weiterer Mutationen auf die Expression	38
3.4.1.	Expression und Induktion von fecB	38
3.4.2.	Induktion durch eisenfreies Citrat	39
3.4.3.	fecA Mutation	39

		Seite
3.4.4.	tonB bzw. exbB Mutation	40
3.4.5.	ompR Mutation	40
3.4.6.	fur Mutation	40
3.4.7.	fecC bzw. fecD Mutation	41
3.4.8.	Anaerobe Wachstumsbedingungen	41
3.5.	Versuch zur Isolierung von fecA::Mu-d1(Ap,lac) Mutanten mit regulierbarer ß-Galactosidaseexpression	44
3.6.	Transduktionsexperimente zur genaueren Kartierung der fec Genregion	44
3.7.	Komplementationsversuche mit rekombinanten Plasmiden und P1-Phagen	47
3.7.1.	Koplementationsversuche mit F'-Plasmiden	48
3.7.2.	Komplementationsversuche mit lysogenen P1ergFCm-Phagen	49
3.8.	Isolierung periplasmatischer Proteine induktionsdefekter Mutanten	49
4.	DISKUSSION	52
4.1.	Isolierung von Eisencitrattransportmutanten mit Hilfe von Streptonigrin	52
4.2.	fecB Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen	53
4.3.	Einfluß weiterer Mutationen auf die fecB Expression	56
4.4.	Modell für die Regulation des Eisencitrat-Transportsystems bei E.coli K12	61
5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	ANHANG - Versuche zur Klonierung der fec Genregion	68
7.	LITERATUR	70

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
Bip	Bipyridin
Cit	Citrat
Cm	Chloramphenicol
Desf.-FC	Desferri-Ferrichrom
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
deion.	deionisiert
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Na-Salz
EGTA	Äthylenglycol-bis(ß-Aminoäthyläther)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
IS-Element	Insertionselement
kb	Kilobasen
Min.	Minuten
M9-Medium	M9-Minimalmedium
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
moi	multiplicity of infection
NB	Nutrient Broth
OD_x	optische Dichte bei x nm
ONPG	o-Nitrophenyl-ß-Galactopyranosid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec.	Sekunden
Std.	Stunden
Tet	Tetracyclin
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Tryptone-Yeast
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

Die Zellhülle von Escherichia coli wie auch die der anderen gramnegativen Bakterien besteht aus einem mehrschichtigen Komplex: der äußeren Membran, der Cytoplasmamembran und dem dazwischen liegenden periplasmatischen Raum mit dem einschichtigen Murein.

Die Cytoplasmamembran ist strukturell ähnlich aufgebaut wie die Plasmamembran von Eukaryontenzellen. Sie besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht mit einer Reihe von integrierten oder assoziierten Proteinen. Hier befinden sich die Enzyme der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung, der Biosynthese von höhermolekularen Membranstrukturkomponenten und der aktiven Transportsysteme (60, 73). Die Energie für die aktiven Transportprozesse liefern das elektrochemische Membranpotential, ATP oder Phosphoenolpyruvat.

Der periplasmatische Raum ist definiert als Raum zwischen der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran. Hier befinden sich lösliche Proteine, darunter Hydrolasen und Bindeproteine von bestimmten Transportsystemen (49). Periplasmatische Proteine können durch osmotischen Schock freigesetzt werden. Das einschichtige Murein ist über kovalent gebundenes Lipoprotein (6) mit der äußeren Membran verbunden. Die Funktion des zusätzlich in freier, nicht mureingebundener Form vorkommenden Lipoproteins ist noch nicht bekannt (21).

Die äußere Membran enthält gegenüber der Cytoplasmamembran einen geringeren Phospholipidanteil und weniger Proteinspecies. An der Außenseite ist ein spezifisches Lipopolysaccharid, dessen O-spezifische Zuckerketten in die Umgebung der Zelle herausragen und für die antigenen Eigenschaften verantwortlich sind (81). Die äußere Membran bildet eine Permeabilitätsbarriere, die vor allem makromolekulare Substanzen von der Cytoplasmamembran fernhält (7,21). Der Lipidanteil verhindert das Eindringen hydro-

philer Substanzen, der Durchtritt hydrophober Substanzen (z.B. Antibiotika, Farbstoffe) wird durch die hydrophilen Zuckerketten des Lipopolysaccharids erschwert. Im Gegensatz zur Cytoplasmamembran können ungeladene und hydrophile Moleküle mit einer Ausschlußgrenze von 600 - 700 Dalton die äußere Membran ungehindert passieren (79). Diese Durchlässigkeit wird durch Proteinkanäle ermöglicht, die bei E.coli K12 von den in der Membran in zahlreichen Kopien vorhandenen Proteinen OmpC (Protein Ib) und OmpF (Protein Ia) gebildet werden (79). Diese Hauptproteine dienen gleichzeitig als Rezeptoren für Phagen (37). Zusätzlich kommt in der äußeren Membran noch ein weiteres Hauptprotein, das Protein OmpA, vor. Es soll an der Konjugation beteiligt sein (88).

Neben den Hauptproteinen existieren in der äußeren Membran noch sog. Nichthauptproteine deren Anzahl stark von den Kulturbedingungen abhängt (70). Sie dienen als Rezeptorproteine für Substrate über der Ausschlußgrenze der Hauptprotein-Kanäle. Daneben können die DNS von Bakteriophagen und Colicine nach Anlagerung an diese spezifischen Rezeptoren durch die beiden Membranen ins Cytoplasma gelangen (14). Der genaue Translokationsprozess ist im Detail noch nicht geklärt (14,64). Eine große Rolle spielen die Rezeptorproteine für die Aufnahme von Eisen (III) mit Hilfe von Eisenkomplexbildnern.

Eisenaufnahme

Eisen ist für alle Mikroorganismen, mit Ausnahme der Milchsäurebakterien, ein lebensnotwendiges Element. Da es in zwei Oxidationsstufen vorkommt, kann es an Redoxreaktionen teilnehmen. Es ist ein Bestandteil von Cytochromen und Eisenschwefelproteinen, die an Elektronentransportwegen beteiligt sind und für mehrere andere Enzyme wie z.B. die Aconitase und die Nitratreduktase. Weiterhin sind Eisenionen wesentlich beteiligt bei Entgiftungsreaktionen von aktivierten Sauerstoffspecies,

die ein Zellgift darstellen (59). Bei Infektionskrankheiten spielt die Eisenversorgung der Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Bei vielen Erregern konnte gezeigt werden, daß ihre Pathogenität bei guter Eisenversorgung gesteigert ist (97). Unter aeroben Bedingungen liegt Eisen im wässrigen Milieu vorwiegend als schwerlöslicher Fe(III)-Hydroxy-Aquokomplex mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-38} Mol/l vor. Bei pH 7 beträgt die Konzentration an freien Fe^{3+}-Kationen 10^{-12} µMol/l. Bakterien benötigen jedoch, um wachsen zu können, eine Eisenkonzentration von 0,1 - 1 µMol/l (15). Damit unter Eisenmangelbedingungen trotzdem eine ausreichende Eisenversorgung gewährleistet ist, haben Bakterien die Fähigkeit entwickelt, das Eisen mittels hochaffiner Komplexbildner über spezifische Transportsysteme aktiv in die Zelle zu schleusen. Bei E.coli K12 kann man mehrere spezifische Eisentransportsysteme unterscheiden. In Abb.1 wird ein Überblick über die bisher gefundenen Eisentransportsysteme gegeben.

Der natürliche Eisenkomplexbildner der Enterobakterien ist das Enterochelin, ein cyclisches Trimeres aus 2,3-Dihydroxy-benzoylserin. Für die Synthese sind mindestens 7 Gene (ent Gene) notwendig. Enterochelin wird aus Vorstufen der Aromatenbiosynthese synthetisiert und ins Medium ausgeschieden. Der Eisen(III)-Enterochelinkomplex bindet an das FepA Protein der äußeren Membran, welches gleichzeitig auch Colicin B als Rezeptor dient (1,53,75,82,83). Mit Hilfe des FepB Genproduktes, wahrscheinlich einer Permease in der Cytoplasmamembran, gelangt der Eisenkomplex ins Cytoplasma (82,103). Dort wird das Eisen(III) freigesetzt durch Spaltung des Enterochelins durch eine spezifische Esterase (FesB Genprodukt) (30). AroB Mutanten sind nicht mehr in der Lage Enterochelin zu synthetisieren, außer es ist 2,3-Dihydroxybenzoesäure im Medium enthalten (36). Dadurch eignen sich diese Mutanten gut für Untersuchungen an spezifischen Eisentransportsystemen.

Eisen(III) kann von E.coli auch mit Hilfe von Ferrichrom aufgenommen werden, einem Eisenkomplexbildner der von

Pilzen produziert wird (41,68). Er gehört zu den Chelatoren vom Hydroxamattyp und ist ein cyclisches Hexapeptid, bestehend aus drei Glycin- und drei N-Acetyl-N-Hydroxy-Ornithinmolekülen. Für die Aufnahme des Eisenkomplexes ist das FhuA Protein notwendig, das auch dem strukturanalogen Antibiotikum Albomycin, dem Colicin M und den Phagen T1, T5 und ϕ80 als Rezeptor dient (12,17,41,45, 47,86). Weiterhin sind für den Ferrichromtransport die Gene fhuB, fhuC und fhuD notwendig (13,26,61,102). Diese Gene sind wahrscheinlich Bestandteil aller Eisentransport-

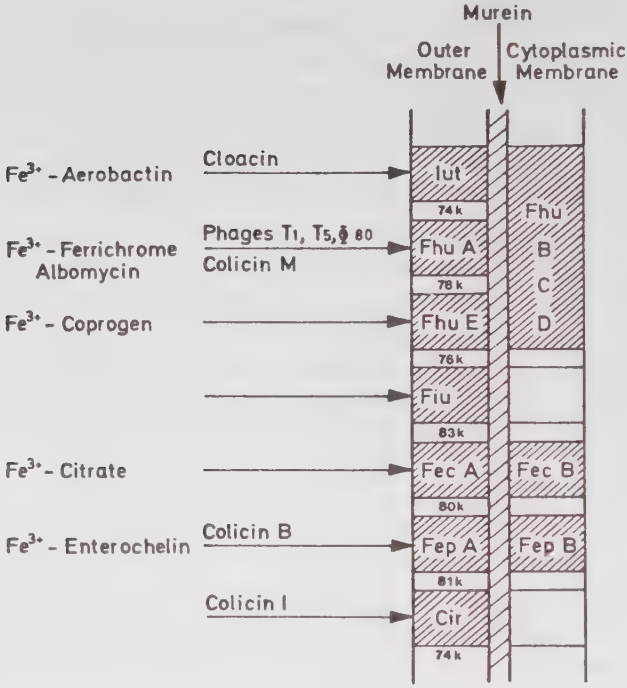


Abb. 1: Übersicht über die beteiligten Komponenten der Eisentransportsysteme von Escherichia coli K12. Unter den Rezeptorbezeichnungen sind deren Molekulargewichte angegeben.

systeme vom Hydroxamattyp. Die FhuC und FhuD Genprodukte befinden sich in der Cytoplasmamembran. Das Eisen(III) wird wahrscheinlich aus dem Ferrichromkomplex unter Reduktion zu Eisen(II) in der Cytoplasmamembran freigesetzt und das Desferri-Ferrichrom durch Acetylierung modifiziert (46,87).

Ein weiterer Eisenchelator vom Hydroxamattyp ist das Aerobactin. Es besteht aus zwei N-Hydroxy-N-Acetyl-Lysinresten und einem Citratanteil. Aerobactin wird von virulenten E.coli-Stämmen, die das ColV-Plasmid tragen, synthetisiert und ins Medium ausgeschieden (9,10). Der Aerobactin-Eisen-Komplex benötigt das Iut Rezeptorprotein, an welches auch Cloacin, ein Bacteriocin von Enterobacter cloacae bindet (4). Die Aerobactinsynthesegene und das Rezeptorgen sind ColV-Plasmid codiert (11). Zusätzlich sind die chromosomalen Gene fhuB, fhuC und fhuD am Aerobactintransport beteiligt (10,11).

Das von bestimmten Pilzen, z.B. Neurospora crassa produzierte Coprogen ist ein dritter Eisenchelator vom Hydroxamattyp. Für dessen Aufnahme ist das Rezeptorprotein FhuE notwendig und wiederum die Hydroxamattransportgene fhuB, fhuC und fhuD (40).

Ein weiteres spezifisches Eisentransportsystem von E.coli-K12 ist das Citratsystem, das nur in Gegenwart von Eisencitrat im Medium ausgeprägt wird (51,52,93,94,101). Für die Aufnahme des Eisencitratkomplexes sind mindestens 2 Genprodukte notwendig. Das FecA Rezeptorprotein in der äußeren Membran und das FecB Genprodukt, das wahrscheinlich analog zu FepB ein Protein der Cytoplasmamembran ist (94). Die fec Gene kartieren bei 7 Min. auf der E.coli K12 Genkarte (1).

Für die Rezeptoren Fiu und Cir sind bis heute keine Eisen-Chelatoren bekannt. Da diese aber unter Eisenmangel induzierbar sind, muß man sie ebenfalls als Bestandteile spezifischer Eisentransportsysteme ansehen. Für das Cir Rezeptorprotein ist bekannt, daß es Colicin I bindet (65).

Für alle hier genannten Eisentransportsysteme ist das TonB

Genprodukt notwendig, das vermutlich die Energie vom energetisierten Zustand der Cytoplasmamembran für die Aufnahme der Eisenkomplexe und Vitamin B12 vermittelt. Die TonB Funktion wird weiterhin für den irreversiblen Angriff der Colicine B, M, I und V sowie der Phagen T1 und ϕ 80 benötigt (35,36,41,42). Für die erwähnten Aufnahmesysteme ist zusätzlich ein Mitwirken der Gene exbB und exbC gezeigt worden (10,11,40,43,83).

Regulation der Eisentransportsysteme

Wird E.coli unter Eisenmangelbedingungen gezüchtet, so führt dies zu einer Derepression der Eisentransportsysteme (8). Die Untersuchung der Regulation wurde mit Hilfe von Genfusionen auf genetischer Ebene durchgeführt. Casadaban und Cohen (18) entwickelten eine Methode, durch die eine Fusionierung der lac Gene mit den Kontrollelementen der fraglichen Gene sehr vereinfacht wurde. Sie klonierten die Strukturgene des lac Operons in den lysogenen Phagen Mu. Dieser Phage kann an beliebigen Stellen der Bakterien-DNS integrieren. Bei richtiger Orientierung der Phagen-DNS werden die lac Strukturgene unter Kontrolle der betroffenen Gene exprimiert. Mit diesem Phagen Mud1-(Ap,lac) wurden Mutanten isoliert, bei denen die Expression der lac Gene durch die intrazelluläre Eisenkonzentration reguliert wurde. Durch Messung der B-Galactosidase-Aktivität konnte die Transkription dieser eisenregulierten Gene quantitativ bestimmt werden (8,38,43,104). Auf diese Weise konnte z.B. gezeigt werden, daß die Expression des fhuA Gens unter Eisenmangelbedingungen das ca. dreifache, die der Gene cir und fepA das 10- bis 20-fache im Vergleich zum eisenreichen Medium beträgt.

Die Eisentransportsysteme werden gemeinsam durch das Fur Genprodukt reguliert (39). In fur Mutanten (ferric uptake regulation) werden fast alle eisenregulierten Gene, ein-

schließlich der plasmidcodierten, nahezu konstitutiv exprimiert. Das Fur Genprodukt ist vermutlich ein Repressorprotein, das abhängig vom intrazellulären Eisengehalt die Expression der eisenregulierten Strukturgene durch Anlagerung an deren Kontrollregionen verhindert. Der fur Phänotyp wurde auch bei S. typhimurium beschrieben (25). In Abb. 2 sind die Gene des E.coli K12 Chromosoms und des Plasmids ColV, die durch den Fur Repressor (R) in Abhängigkeit vom intrazellulären Eisengehalt reguliert werden, schematisch dargestellt. Der Komplex R•Fe verhindert bei guter Eisenversorgung der Zelle die Transkription der entsprechenden Gene.

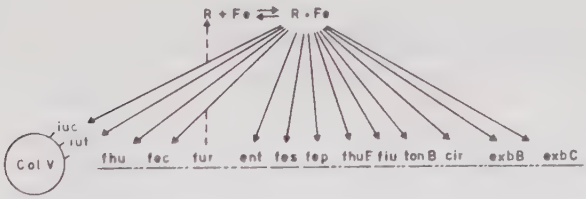


Abb. 2

In der vorliegenden Arbeit wurde das Eisencitrat-Transportsystem von E.coli K12 untersucht. Die Fähigkeit pathogener Mikroorganismen, das Eisen ihrem Wirt zu entziehen, muß man als Virulenzfaktor ansehen (97). Die Eisenaufnahme mittels Citrat kann hierbei eine große Rolle spielen. So wurde z.B. gezeigt, daß Citrat die hemmende Wirkung von Lactoferrin auf coliforme Bakterien aufheben kann (5). Citrat ist im Humanserum der Eisenchelator mit dem niedrigsten Molekulargewicht. Dort ist es beteiligt am Transfer des Eisens vom bzw. zum Transferrin (2). Ein Eisentransportsystem mittels Citrat wurde schon bei mehreren Mikroorganismen nachgewiesen, wie z.B.

bei Mycobacterium smegmatis,(76), Pseudomonas aeruginosa (20), Escherichia coli (28). Bei E.coli existieren hinsichtlich des Eisencitrat-Transportsystems stammspezifische Unterschiede. Während E.coli K12 und E.coli B/r das System haben, fehlt es in E.coli W (95,107). Bei S. typhimurium fehlt dieses System ebenfalls (93).

Die Besonderheit des Eisencitrat-Transportsystems gegenüber den anderen Eisenaufnahmesystemen ist seine Regulation. Es wird nur exprimiert wenn extrazelluläres Eisencitrat vorliegt, d.h. es wird von außen induziert (51,52).

Induktion des Eisencitrat-Transportsystems

Das Grundprinzip der Induktion besteht darin, daß die Zelle die Gene für die Synthese von Proteinen nur dann exprimiert, wenn diese benötigt werden. Die Induktion wird durch den Induktor eingeleitet, er ist Vermittler zwischen Umwelt und Genom. Das bekannteste Beispiel für ein induzierbares System ist das lac Operon (58). Der vom Regulatorgen I gebildete Repressor blockiert die Operatorregion des Operons, wenn keine Lactose im Medium vorhanden ist. Dadurch wird die Synthese von Enzymen verhindert, deren Substrat fehlt. Gelangt der Induktor Lactose in die Zelle, verbindet er sich mit dem Repressor, der daraufhin nicht mehr mit dem Operator reagieren kann, so daß die Transkription stattfinden kann. Dieses Induktionsmodell ist in vielen induzierbaren Systemen verwirklicht. Neben diesem Modell gibt es Systeme, bei denen man eine Induktion von außen annimmt, wie z.B. die Induktion des Hexosephosphataufnahmesystems (HPS) durch Glukose-6-Phosphat (G6P) (24, 27,99,100) und die des Dicarbonsäureaufnahmesystems bei Azotobacter vinelandii (84). Während 0,1mM extrazelluläres G6P für die Induktion des HPS ausreichte, konnte

durch 60mM intrazellulär aus dem Glukosestoffwechsel akkumuliertes G6P keine Induktion gefunden werden. Mit Hilfe von Genfusions-Mutanten konnte gezeigt werden, daß für die Induktion kein Transport des Induktors G6P in die Zelle notwendig ist (89). Es existieren Hinweise dafür, daß G6P an ein Rezeptorprotein der äußeren Membran bindet und dadurch die Genaktivität des Aufnahmesystems reguliert wird (29).
Das Eisencitrat-Transportsystem wird ebenfalls von außen induziert. Dabei ist der Eisencitratkomplex als Induktor anzusehen (51). Während 0,1mM Citrat für die Induktion des Eisencitrattransportsystems ausreicht, kann das intrazelluläre Citrat mit einer Konzentration von 5mM die Induktion nicht einleiten. Neben der Induktion durch Eisencitrat wird das System noch durch den intrazellulären Eisengehalt über das Fur Genprodukt reguliert. Unter Eisenmangelbedingungen wird das System dereprimiert (38,39).
Die Induktion des Eisencitrat-Transportsystems von außen ist ein für die Zelle ökonomischer Mechanismus, da trotz dem Vorhandensein von genügend intrazellulärem Citrat das System reguliert werden kann. Voraussetzung dafür ist, daß die Zelle zwischen intrazellulärem und von außen kommenden Citrat unterscheiden kann. Über den Mechanismus der Induktion kann man vorläufig nur spekulieren.
Im Gegensatz zu vielen anderen gramnegativen Enterobakterien kann E.coli mit Citrat als C-Quelle nicht wachsen (66). Da zellfreie Extrakte Citrat oxidieren können (67) nimmt man an, daß ein für die Aufnahme verantwortliches Transportsystem fehlt bzw. nicht exprimiert wird. Im Gegensatz zu E.coli besitzt z.B. S.typhimurium ein durch Citrat induzierbares Transportsystem und die Fähigkeit Citrat als C-Quelle zu verwerten (54,62). Dies stellt ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Organismen dar. Unter anaeroben Bedingungen wird auch in E.coli ein Citrattransportsystem induziert.

Hier kann die Citratverwertung aber nur erfolgen, wenn zusätzlich Reduktionskraft durch ein zweites Substrat zur Verfügung steht, da das Enzym Oxalacetatdecarboxylase nicht gebildet wird (72). In neuerer Zeit wurden E.coli Mutanten isoliert, die auch unter aeroben Bedingungen das Citrattransportsystem induzierten. Die verantwortlichen Gene wurden in der gal Genregion kartiert (34). Außerdem konnten eine ganze Reihe Stämme isoliert werden, die bei Anwesenheit eines Plasmids Citrat verwerten können (55,56,57). Bis heute existieren keine Hinweise dafür, daß das Citrat- und das Eisencitrat-Aufnahmesystem gemeinsame Transportkomponenten besitzen.

Problemstellung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten zur weiteren Aufklärung des Eisencitrat-Transportsystems und seines Induktionsmechanismus beitragen. Mit Hilfe der Genfusionstechnik sollte die Regulation des Systems untersucht werden. Die Isolierung und Charakterisierung weiterer Mutanten sollte Informationen über die am Aufnahmesystem beteiligten Gene geben. Durch Kartierungsexperimente sollte deren Position in der fec Genregion bei 7 Min. auf der E.coli K12 Genkarte bestimmt werden. Weiterhin sollte versucht werden, die Genprodukte bzw. deren Position in der Zelle zu identifizieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Alle nicht aufgeführten verwendeten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

Acrylamid	Serva-Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, s.o.
Ampicillin	Sigma Chemie GmbH, München
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Tryptone	Difco, s.o.
Bromphenolblau, Na-salz	Serva, s.o.
Chloramphenicol	Serva, s.o.
Desoxyribonuklease I	Serva, s.o.
EGTA	Sigma, s.o.
Kanamycin	Serva, s.o.
Lysozym	Sigma, s.o.
MacConkey Agar Base	Difco, s.o.
2-Mercaptoäthanol	Serva, s.o.
MNNG	Fluka AG, Buchs
Nutrient Broth	Difco, s.o.
ONPG	Serva, s.o.
SDS	Serva, s.o.
Serva Blau G	Serva, s.o.
Streptomycinsulfat	Serva, s.o.
Tetracyclin	Sigma, s.o.
TMED	Serva, s.o.
Yeast Extract	Difco, s.o.

Das Streptonigrin stammte von Drug Synthesis & Chemistry Branch, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, Bethesda, Md.
Albomycin war aus dem Bestand des Instituts.

2.2. Nährmedien und Puffer

TY-Medium :	Bacto Tryptone	10 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

NB-Medium :	Nutrient Broth	8 g
	NaCl	5 g

Mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

Fec-Medium : Nach dem Autoklavieren von NB-Medium wurde 200 µM Bipyridin und 1 mM Citrat zugegeben. AroB Mutanten konnten in diesem Medium nur wachsen, wenn sie ein intaktes Eisencitrat-aufnahmesystem hatten.

M9-Salzlösung (10x) :	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	75 g
	KH_2PO_4	30 g
	NaCl	5 g
	NH_4Cl	10 g

Mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Medium :	bidest. Wasser	90 ml
	M9-Salzlösung (10x)	10 ml
	Glukoselösung (40%)	1 ml
	Na-Citratlösung (1M)	1 ml
	Thiaminlösung (1mg/ml)	1 ml
	$MgSO_4$-Lösung (1M)	0,1 ml
	$CaCl_2$-Lösung (0,1M)	0,1 ml

Das M9-Medium wurde für aroB Mutanten folgendermaßen supplementiert:

Tryptophan-, Tyrosin-, Phenylalanin-stammlösung (TTP) (je 1 mg/ml)	10 ml
p-Aminobenzoesäure-, p-Hydroxy-benzoesäurestammlösung (2mM)	2 ml

auf 100 ml M9-Medium

Aminosäuren wurden in einer Konzentration von 40 µg/ml zugegeben.

Bei Verwendung von Lactose als C-Quelle wurde zu 100 ml Medium 1 ml einer 20 %igen Stammlösung gegeben.

Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurden 15 g/l Bacto Agar zugegeben.
Der Top-Agar bestand aus TY-Medium und 6,5 g Bacto Agar /l.

Streptonigrinselektionsplatten :

Es wurden M9-Platten verwendet mit den entsprechenden Zusätzen und 5 µg/ml Streptonigrin.

Saline : 0,9 % NaCl in bidest. Wasser gelöst.

Phagenadsorptionspuffer : $MgSO_4$ 0,1 M
$CaCl_2$ 0,005 M
gelöst in bidest. Wasser

Puffer für Messung der ß-Galactosidase-Aktivität : $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,1 M
$MgSO_4$ 0,001 M
ß-Mercaptoäthanol 0,05 M
gelöst in deion. Wasser, einstellen auf pH 7,0

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	25 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml

2.3. Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen

2.3.1. Bakterienstämme

Stamm	Genetische Eigenschaften	Herkunft
YMel (13)	WT	K. Altendorf
AB2847 (86)	aroB malT tsx thi	Mikro II
H455 (455)	wie AB2847, jedoch pro lac	K. Hantke (38)
H1080 (1080)	wie AB2847, jedoch zhe::Tn10	K. Hantke
H1290 (1290)	wie H455, jedoch cys fur74	K. Hantke (38)
H1368 (1368)	wie AB2847, jedoch zaq::Tn10	K. Hantke (52)
H1389 (1389)	wie H455, jedoch exbB::Tn10	K. Hantke (43)
H1443 (1443)	aroB araD lac thi rpsL	K. Hantke (40)
H799 (799)	wie H1443, jedoch fecB:: Mud1(Ap,lac)	K. Hantke
H1452 (1452)	wie AB2847, jedoch tonB, zch::Tn10	K. Hantke
WA27 (516)	wie AB2847, jedoch fecB	W. Wagegg (93)
WA380 (526)	wie AB2847, jedoch fecA	W. Wagegg (93)
WA1052 (514)	wie AB2847, jedoch fepA, ompR	W. Wagegg (93)
JC10240 (353)	HfrP045 thr recA56 ilv srl::Tn10 rel spc	M. Achtmann
N541 (609)	proAB lac his argF argI met P1argFCm13	M. York (106)
1A10 (610)	proAB lac his argF argI met P1argFCm0	M. York (106)

Stamm	Genetische Eigenschaften	Herkunft
PC0950 (601)	HfrR4 thr argI argF serB purA fhuA relA spoT	B. Bachmann
286 (91)	lac F'lac pro	Mikro II
TM-1 (342)	proAB lac F'proAB lac	J. Miller (77)
C600 (495)	thr leu lac thi F'lac	J. Collins (19)
MXR (604)	galE recA F'lac proAB Mu18A-1	A. Toussaint (92)
RH95 (768)	F'lac purE	R.C. Deonier (50)
RH72 (770)	pro lac supE recA rpsL F'lac proAB	R.C. Deonier (50)
P4X-1 (771)	metB rel F'$\alpha_3\beta_3$	R.C. Deonier (22)

Die Zahlen in Klammern hinter den Stammbezeichnungen geben die Stamm-Nr. in der Stammsammlung Mikrobiologie II, Tübingen, an.

2.3.2. Eigenschaften von Mutanten, die während der Arbeit isoliert und charakterisiert wurden

Stamm	Genetische Eigenschaften	Isolierung nach
ZI311	wie H1443, jedoch fecA, recA, srl::Tn10	2.13./2.5.2./ 2.7.3.1.
ZI317	wie WA27, jedoch lac::Tn5	2.14.
ZI323	wie WA380, jedoch zag::Tn10	2.7.2. von zag::Tn10 Donor:H1368
ZI325	wie H799, jedoch fecA, zag::Tn10	2.7.2. von zag::Tn10, fecA / Donor: ZI323
ZI341	wie H799, jedoch exbB::Tn10	2.7.3.3.

Stamm	Genetische Eigenschaften	Isolierung nach
ZI342	wie H799, jedoch tonB, zch::Tn10	2.7.3.2.
ZI345	wie H1443, jedoch zag::Tn10	2.7.2. von zag::Tn10 Donor: H1368
ZI359	wie H799, jedoch zag::Tn10	2.7.2. von zag::Tn10 Donor: ZI345
ZI367	wie AB2847, jedoch lac::Tn10	2.14.
ZI370	wie H1443, jedoch fecB, recA srl::Tn10	2.13./2.5.2. 2.7.3.1.
ZI373	wie WA380, jedoch fecD	2.7.2. von fecA$^+$ Donor: AB2847
ZI379	wie ZI367, jedoch fecA:: Mud1(Ap,lac)	2.9./2.5.2.
ZI389	wie H799, jedoch ompR	2.13.
ZI395	wie H799, jedoch fhuA	2.8.
ZI396	wie H1443, jedoch exbB	2.13./2.5.2.
ZI404	wie H799, jedoch fecC	2.13.
ZI405	wie H799, jedoch fecD	2.13.
ZI406	wie H1290, jedoch fecB:: Mud1(Ap,lac)	2.7.3.4.
ZI407	wie PC0950, jedoch aroB, zhe::Tn10	2.7.2. von aroB, zhe::Tn10 Donor: H1080
ZI411	wie WA1052, jedoch lac::Tn5, fecB::Mud1(Ap,lac)	2.7.3.4. /2.7.2. von lac::Tn5 Donor: ZI317
ZI418	wie H1443, jedoch fecB:: Mud1(Ap,lac)	2.10./2.5.2.

Die Bakteriophagen T1, T5, P1, λ NK370 und λO_{am}::Tn5 CI857 wurden von Herrn Dr. K. Hantke zur Verfügung gestellt.

2.4. Kulturbedingungen

2.4.1. Aerobes Wachstum

Übernachtkultur: Auf TY-Agarplatten gewachsene Zellen wurden in 10 ml TY-Medium über Nacht im Trockenschüttler angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen zum Animpfen der Hauptkultur verwendet.
Hauptkultur: Die Bakterienstämme wurden in 100 ml Kolben mit einer Schikane oder in 20 ml Gläschen im Schüttelbad bei 180 Upm angezogen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm mit einem "Eppendorf-Photometer" verfolgt. Mu- bzw. P1argFCm-lysogene Stämme wurden wegen des temperatursensitiven Repressors des Bakteriophagen bei 30°C gehalten, alle anderen Stämme bei 37°C.

2.4.2. Anaerobes Wachstum

Die anaerobe Anzucht von Zellen wurde in 50 ml Meplatflaschen durchgeführt, die mit Inkubationsmedium bis zum Rand gefüllt waren. Nach dem Animpfen wurden sie mit einem Deckel verschlossen. Die Flaschen wurden anschließend im Brutschrank inkubiert.

2.5. Streptonigrinversuche

2.5.1. Bestimmung der Überlebendkeimzahl nach Streptonigrineinwirkung

Die Mutanten wurden ausgehend von TY-ÜNK in M9-Medium + 10mM Citrat bis zur OD_{578} von 0,2 gezüchtet. Danach wurde jeder Kultur 5 µg/ml Streptonigrin zugesetzt und

im Schüttler weiterinkubiert. Nach 10 Min., 30 Min., 50 Min. und 70 Min. wurden jeweils Zellproben entnommen und verschiedene Verdünnungen davon auf TY-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet.

2.5.2. Streptonigrinselektion von Mutanten im Eisen-Citrat-Transportsystem

Nach Mutagenese eines geeigneten Stammes mit MNNG (2.13.) bzw. mit dem Phagen Mud1(Ap,lac) (2.10.) wurden 0,5 ml Kultur (OD_{578} ca. 0,5) in 5 ml Fec-Medium gegeben und für 2 Std. inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf Streptonigrinselektionsplatten (2.2.) ausplattiert. Die Platten wurden 2 - 4 Tage inkubiert. Entstandene Kolonien wurden auf Fec-Platten auf Wachstum getestet. Nicht oder nur schlecht wachsende Kolonien wurden weiter untersucht.

2.6. Cycloserinanreicherung

2.6.1. Cycloserinanreicherung von Mutanten im Eisencitrat-Transportsystem

Nach der Mutagenese des entsprechenden Stammes mit dem Phagen Mud1(Ap,lac) (2.10.) wurden 0,1 ml Zellen (OD_{578} ca. 2) in 5 ml Fec-Medium mit Ampicillin gegeben und für 3 Std. geschüttelt. Anschließend wurden 100 µg/ml Cycloserin zugegeben und für weitere 5 Std. inkubiert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (15 Min., 4000 Upm), in 5 ml NB-Amp-Medium resuspendiert und über Nacht im Schüttler inkubiert. Der Vorgang der Cycloserinanreicherung wurde 4 Tage hintereinander wiederholt. Nach der letzten Anreicherung wurden verschiedene Verdünnungen

auf TY-Amp-Platten ausplattiert und für 48 Std. inkubiert. Geeignete Platten (mit höchstens 200 Kolonien) wurden auf Fec-Platten und gleichzeitig auf N8-Platten überstempelt. Kolonien, die auf den Fec-Platten nicht oder nur schlecht wuchsen, wurden weiter untersucht.

2.6.2. Cycloserinanreicherung von Mutanten mit reduzierter ß-Galactosidaseexpression

Der mit MNNG mutagenisierte Stamm (2.13.) wurde in 5 ml M9-Medium mit 0,2 % Lactose als C-Quelle für 3 Std. angezogen. Anschließend wurde 100 µg/ml Cycloserin zugegeben und die Zellen für weitere 5 Std. inkubiert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert, in 1 ml TY-Medium resuspendiert und verschiedene Verdünnungen auf Lac-MacConkey-Platten mit Amp ausplattiert. Die Platten wurden für 48 Std. inkubiert.

2.7. P1-Transduktionen

2.7.1. Herstellung eines P1-Phagenlysats

Zu 3 ml TY-Top-Agar wurden 0,1 ml P1-Phagenlysat und 0,1 ml einer ÜNK des Donorstammes bei der Transduktion gegeben, durchmischt und auf einer TY-Platte gleichmäßig verteilt. Nach 7 bis maximal 9 Std. Inkubation (abhängig von der Inkubationstemperatur) im Brutschrank wurde mit einem sterilen Spatel die Weichagarschicht in ein Gläschen mit 2 ml TY-Medium abgekratzt. Nach Zugabe von 0,5 ml Chloroform wurde auf dem Vortex kräftig durchmischt und der Ansatz 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde für 10 Min. bei 4500 Upm in der Christzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand stellte das Phagenlysat dar und wurde in einem sterilen Reagenz-

glas mit einem Tropfen Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

2.7.2. Generelle P1-Transduktion

2 ml einer ÜNK des Rezipienten in TY-Medium wurden 10 Min. bei 4500 Upm zentrifugiert, das Sediment in 1 ml Phagenadsorptionspuffer resuspendiert und 15 Min. im Wasserbad geschüttelt. Zu 0,1 ml Zellen wurden 0,1 ml P1-Phagenlysat (jeweils 0. und 1. Verdünnung) gegeben und die Gläschen zur Adsorption der Phagen 30 Min. inkubiert. Danach wurde jedem Gläschen 0,2 ml 1M Na-Citratlösung zugesetzt und alle Ansätze auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Zur Kontrolle wurden die Rezipientenzellen und das P1-Phagenlysat auf den Selektionsplatten ausgestrichen.
Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert.
Bei Transduktionen, bei denen als Rezipienten *fec* Mutanten dienten, wurde die Phagenadsorption durch Zugabe von 0,2 ml 0,2M EGTA gestoppt, da diese Mutanten bei Anwesenheit von Citrat schlechter wachsen.

2.7.3. Übertragung verschiedener Mutationen durch P1-Transduktion

2.7.3.1. Übertragung der recA Mutation

Es wurde ein P1-Lysat vom Stamm JC10240 (=Donor) hergestellt und der Rezipient damit infiziert. Selektiert wurde auf *srl*::Tn*10* (Tetracyclinresistenz). Die *recA* Mutation wurde zu ca. 50 % mit *srl*::Tn*10* cotransduziert. Nachgewiesen wurde die Mutation mit Hilfe eines UV-Empfindlichkeitstests. Dazu wurden die Transduktanten auf einer TY-Platte quergestrichen und abgestuft 10 Sec., 20 Sec., 30 Sec. und 40 Sec. mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (Universal UV-Lampe der Firma CAMAG, Abstand 10 cm). Die Platten wurden über Nacht inkubiert. *recA*$^+$ Stämme zeigten keine Beeinflußung des Wachstums, wohin-

gegen recA Mutanten in bestimmten Bereichen kein oder nur geringes Wachstum (Einzelkolonien) zeigten.

2.7.3.2. Übertragung der tonB Mutation

Als Donor diente der Stamm H1452. Selektiert wurde auf zch::Tn10 auf TY-Tet-Platten. Die tonB Mutation wurde zu 70 % mit zch::Tn10 cotransduziert. Die tetracyclinresistenten Mutanten wurden auf TY-Tet-Platten vereinzelt und anschließend im Querstrichtest (2.9.) auf T1-Empfindlichkeit getestet. tonB Mutanten verhielten sich T1-resistent.

2.7.3.3. Übertragung der exbB Mutation

Als Donor diente der Stamm H1389. Selektiert wurde auf exbB::Tn10 auf TY-Tet-Platten. Die tetracyclinresistenten Mutanten wurden im Querstrichtest (2.9.) auf Albomycinempfindlichkeit getestet. exbB Mutanten verhielten sich albomycinresistent.

2.7.3.4. Übertragung der fecB::Mud1(Ap,lac) Mutation

Als Donor diente der Stamm H799. Die Transduktanten wurden selektiert auf Lac-MacConkey-Amp-Platten. Rote Kolonien wurden untersucht auf Cotransduktion der Mutation mit zag::Tn10 und auf Wachstum mit Citrat.

2.8. Isolierung von fhuA Mutanten

fhuA Mutanten wurden mit Hilfe des Phagen T5 isoliert. Dazu wurden 0,1 ml Zellen einer ÜNK des Ausgangsstammes in 3 ml TY-Top-Agar auf einer TY-Platte ausgegossen. Nach dem Erstarren der Top-Agarschicht wurden 0,05 ml

T5-Phagenlysat (Titer ca. 10^6/ml) aufgetropft und die Platte über Nacht inkubiert. Kolonien, die im T5-Lysehof entstanden waren wurden auf TY-Platten vereinzelt und im Querstrichtest (2.9.) auf T5-Sensitivität getestet.

2.9. Querstrichtest

Mit diesem Test wurde die Sensitivität von Bakterien gegenüber Phagen oder Antibiotika getestet. Dazu wurde die Testlösung auf einer TY-Platte quergestrichen. Nachdem die Lösung eingetrocknet war, wurden quer dazu die zu prüfenden Bakterienstämme ausgestrichen und inkubiert. Eine Hemmung des Wachstums im Diffusionsbereich der Testlösung zeigte Sensitivität an.

2.10. Mutagenese mit dem Phagen Mud1(Ap,lac)

2.10.1. Herstellung eines Mud1(Ap,lac)-Phagenlysats

Der Stamm MAL103 wurde, ausgehend von Einzelkolonien auf TY-Amp-Platten, in 5 ml TY-Medium bei 30°C unter guter Belüftung bis zur OD_{578} von 0,1 angezüchtet. Diese Kultur wurde für 20 Min. bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 37°C für ca. 50 Min. geschüttelt bis eine klare Lösung entstand (Bakterienlyse!). Danach wurde 1 Vol. % Chloroform zugegeben, gut durchgemischt und für 5 Min. bei 37°C weitergeschüttelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer in der Christzentrifuge bei 4500 Upm, 15 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und spätestens am nächsten Tag verwendet. Das verwendete Phagenlysat sollte nicht älter

als 1 oder 2 Tage sein, da danach die Anzahl der infektiösen Phagen schnell abnimmt. Ein frisches Phagenlysat hat einen Titer von ca. 10^{10}/ml.

2.10.2. Isolierung von Mutanten, die den Phagen Mud1(Ap,lac) lysogen enthalten

Die ÜNK eines geeigneten Elternstammes (lac$^-$) wurde mit TY-Medium auf eine OD_{578} von 1,0 verdünnt und anschließend auf 10mM an $MgSO_4$ und 5mM an $CaCl_2$ eingestellt. 0,1 ml Zellen und 0,1 ml Mud1(Ap,lac)-Lysat (1:10 verdünnt) wurden zusammen in ein großes Reagenzglas gegeben, durchmischt und 20 Min. bei 30°C stehend inkubiert. Danach wurden 0,2 ml 1M Na-Citratlösung und 1 ml TY-Medium zugegeben, durchmischt und für ca. 2 Stunden unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde Ampicillin zugegeben und erneut für 1 Std. inkubiert. Die überlebenden Bakterien waren lysogen für den Phagen Mud1(Ap,lac) und konnten weiteren Selektionsbedingungen unterzogen werden.

2.11. Testplatten für β-Galactosidase-Aktivität

Hierfür wurden Lac-MacConkey-Platten verwendet. Die Platten wurden nach Vorschrift des Herstellers angefertigt. Eine rote Kolonienfarbe deutete auf gute β-Galactosidase-Aktivität, eine rosa bzw. weiße Kolonienfarbe auf geringe bzw. keine Aktivität hin.

2.12. Messung der β-Galactosidase-Aktivität (77)

Es wurden 20 ml Medium in einem 100 ml Kolben mit einer Schikane mit 0,05 ml ÜNK des Teststammes angeimpft und

im Schüttelbad bei 180 Upm inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurde eine Probe von 0,5 ml entnommen und in einem Eppendorfgefäß in der Minifuge abzentrifugiert. Das Sediment wurde bis zur Aktivitätsbestimmung der ß-Galactosidase eingefroren. Gleichzeitig wurde bei jeder Probeentnahme die OD_{578} bestimmt.
Zur Aktivitätsbestimmung wurde jedes Sediment in 1 ml Puffer (2.2.) resuspendiert und in Reagenzgläser überführt. Zu jedem Gläschen wurden 1 Tropfen 0,1 % SDS-Lösung und 2 Tropfen Chloroform gegeben. Die Gläschen wurden 10 Sec. auf dem Vortex gemischt und anschließend für 5 Min. in ein Wasserbad mit 28°C gestellt.

Prinzip der Aktivitätsmessung:

$$\text{ONPG} \xrightarrow{\text{ß-Galactosidase}} \text{O-Nitrophenol} + \text{Galactose}$$

Die Menge an gebildetem O-Nitrophenol (gelb) ist ein Maß für die ß-Galactosidase-Aktivität.
Durch Zugabe von 0,2 ml ONPG (4 mg/ml H_2O) zu jedem Gläschen und Durchmischen auf dem Vortex wurde die Enzymreaktion gestartet. Wenn die Proben genügend gelb erschienen bzw. nach maximal 10 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Na_2CO_3 gestoppt und die Reaktionszeit notiert. Von jeder Probe wurde nun die OD bei 546 nm und 405 nm im Eppendorf-Photometer gegen die Blindprobe bestimmt. Zusammensetzung der Blindprobe: 1 ml Puffer, 1 Tropfen 0,1 % SDS, 0,2 ml ONPG und 0,5 ml Na_2CO_3.
Die OD_{405} sollte kleiner sein als 0,9. Ansonsten wurden die Proben mit dem Blindprobenansatz verdünnt.
Die Aktivität der ß-Galactosidase wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Aktivität} = \frac{OD_{405} - 1{,}59 \cdot OD_{546}}{t \cdot V \cdot OD_{578} \cdot 0{,}0045} \left[\frac{\text{Mol ONPG}}{10^9 Z \cdot \text{Min.}}\right]$$

wobei t der Zeit der Enzymreaktion in Minuten, V dem Volumen der entnommenen Probe in ml entspricht.

2.13. Mutagenese mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-guanidin (MNNG)

10 ml TY-Medium wurden mit 0,1 ml einer ÜNK des Ausgangsstammes angeimpft und bis zur OD_{578} von ca. 0,3 gezüchtet. Anschließend wurden 5 ml der Kultur 10 Min. bei 4500 Upm abzentrifugiert und zweimal in 4 ml Na-Citratpuffer (0,1M, pH 5,5) gewaschen. Das Sediment wurde erneut in 4 ml Citratpuffer resuspendiert und die Zellsuspension in 2 Röhrchen aufgeteilt. Zu den Röhrchen wurden 0,1 ml bzw. 0,05 ml MNNG-Lösung (1 mg/ml Citratpuffer) zugegeben und die beiden Ansätze für 30 Min. bei 400 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 Min. bei 4500 Upm abzentrifugiert, einmal mit M9-Medium gewaschen und schließlich in 10 ml M9-Medium für ca. 3 Std. inkubiert. Danach konnte die Selektion der gewünschten Mutanten erfolgen.

2.14. Isolierung von lac::Tn5 bzw. lac::Tn10 Mutanten

In beiden Fällen wurde als Ausgangsstamm der Stamm YMel verwendet. Die Mutagenesen wurden mit Hilfe der Phagen λ NK370 (Tn10) und λO_{am}::Tn5CI857 durchgeführt (63,3). Für die Tn5 Mutagenese wurde der Stamm YMel in TY-Medium + 0,4 % Maltose zu einer OD_{578} von 0,5 angezüchtet, abzentrifugiert und in 1/20 Volumen 10mM $MgCl_2$ resuspendiert. Die Kultur wurde 30 Min. bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Infektion mit dem Phagen λO_{am}::Tn5CI857 mit einer moi von 0,2. Die Zellen wurden für 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen, danach 30 Min. bei 42°C und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Verdünnungen auf den Selektionsplatten ausplattiert. Als Selektionsplatten wurden TY-Platten mit 2,5mM Natriumpyrophosphat und dem entsprechenden Antibiotikum (Tn5: Kanamycin, Tn10: Tetracyclin) verwendet. Von jedem Ansatz wurden 5000 gewachsene Kolonien

in TY-Medium gemischt und davon verschiedene Verdünnungen auf Lac-MacConkey-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Weiße Kolonien wurden gepickt und das darin enthaltene Transposon in weitere lac$^+$ Stämme transduziert. Die beiden daraus entstandenen lac$^-$ Stämme ZI317 (lac::Tn5) und ZI367 (lac::Tn10) wurden weiter verwendet.

2.15. Schnellmethode zur Isolierung der äußeren Membran von E.coli

50 ml Medium wurden mit 0,5 ml einer ÜNK des Teststammes angeimpft und bis zu einer OD_{578} von ca. 0,5 gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert (5000 Upm, 10 Min., 4°C). Der Überstand wurde dekantiert. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und in 0,5 ml 0,2M Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert. Nacheinander wurden folgende Lösungen zugegeben:
1 ml 1M Sucrose in 0,2M Tris-HCl, pH 8,0 , 0,1 ml 10mM EDTA und 0,1 ml Lysozym (2 mg/ml). Der Ansatz wurde gemischt und danach 3,2 ml bidest. Wasser zugegeben. Nun wurde die Zellösung bei Raumtemperatur stehen gelassen bis sich Sphäroblasten bildeten (ca. 5 - 10 Min.). Anschließend wurden 5 ml Extraktionspuffer (2 % Triton X100, 50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$) und 0,1 ml DNase (1 mg/ml) hinzugegeben. Der Ansatz wurde gut durchgeschüttelt und dann gewartet, bis die Lösung nicht mehr viskös war. Danach wurden die Membranen in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert (1 Std., 18000 Upm, 4°C). Die Membranen wurden in Eppendorfgefäßen zweimal mit bidest. Wasser gewaschen, wobei jeweils 10 Min. in der Minifuge zentrifugiert wurde. Die Membranen wurden in 30 µl bidest. Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (69)

Es wurde eine Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments verwendet. Die Gele waren 1,5 mm dick und 12 cm lang. Alle Lösungen wurden mit bidest. Wasser angesetzt.
Das Trenngel enthielt 11 % Acrylamid und 0,1 % Methylenbisacrylamid in 0,375M Tris-HCl, pH 8,8 mit 0,2 % SDS und 0,02 % Ammoniumpersulfat. Nach dem Evakuieren erfolgte der Start der Polymerisation mit 0,02 % Tetramethyläthylendiamin (TMED). Das eingefüllte Trenngel wurde mit 0,5 ml Isobutanol überschichtet. Die Länge des Trenngels betrug ca. 10 cm.
Das Konzentrierungsgel enthielt 3 % Acrylamid und 0,08 % Methylenbisacrylamid in 0,125M Tris-HCl, pH 6,8 mit 0,1 % SDS und 0,02 % Ammoniumpersulfat. Die Polymerisation erfolgte wie beim Trenngel. Die Länge des Konzentrierungsgels betrug 1,5 - 2 cm. Das fertige Gel wurde in einer feuchten Chromatographiekammer im Kühlraum bei 4°C für 16 - 20 Std. aufbewahrt.
Die Membranproteine, in bidest. Wasser suspendiert, wurden in einem Aufnahmepuffer mit 0,0625M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoäthanol und 0,002 % Bromphenolblau aufgenommen. Diese Proteinproben wurden vor der Elektrophorese 5 Min. gekocht und in 5 - 20 µl Portionen auf das Gel aufgetragen. Nicht gebrauchte Proteinproben wurden bei -20°C eingefroren und konnten nach jeweiligem erneuten Kochen wiederholt aufgetragen werden.
Als Stromquelle für die Durchführung der Gelelektrophorese diente ein Gerät der Firma LKB. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0,025M Tris, pH 8,3 mit 0,19M Glycin und 0,1 % SDS. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 14 mA durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 4 bis 5 Std., sie wurde abgebrochen, wenn die Bromphenolblaubande ca. 1 cm vom Ende des Gels entfernt war.
Das Gel wurde nach der Elektrophorese in einer Färbe-

lösung mit 0,17 % Serva Blau G in 50 % Methanol und 10 % Eisessig 2 Std. gefärbt und anschließend mit einer Lösung aus 5 % Methanol und 7,5 % Eisessig wieder entfärbt.

2.17. Isolierung periplasmatischer Proteine (80)

Die Zellen wurden, ausgehend von ÜNK, in 1 l Medium bis zur OD_{578} von 1,0 gezüchtet. Anschließend wurden sie in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert (15 Min., 4000 Upm, 4°C) und danach insgesamt dreimal mit 200 ml eiskalter Lösung aus 0,01M Tris-HCl, 0,03M NaCl, pH 7,1 gewaschen. Danach wurde das Zellsediment in 15 ml 0,03M Tris-HCl, pH 7,1 bei 20°C resuspendiert und das gleiche Volumen 40 % Sucrose, 0,03M Tris-HCl, pH 7,1 unter Rühren mit einem Magnetrührer zugegeben. In die Suspension wurde unter weiterem Rühren 3 ml 10mM EDTA zugetropft. Die Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 23°C, 10 Min. bei 500 Upm geschüttelt und die Zellen anschließend abzentrifugiert (10 000 Upm, 15 Min., 4°C). Der Überstand wurde abgegossen, das Sediment von restlicher Sucroselösung durch Auswischen des Bechers befreit und schnell in 20 ml eiskalter, 0,5mM $MgCl_2$-Lösung mit dem Magnetrührer suspendiert. Die Suspension wurde 10 Min. im Eisbad bei 400 Upm (Wasserbadschüttler) geschüttelt und abzentrifugiert (10 000 Upm, 15 Min., 4°C). Der Überstand = Schockflüssigkeit wurde vorsichtig abgegossen und in ausgekochten Dialyseschläuchen gegen 2 l 0,01M Tris-HCl, pH 7,1 bei 4°C 2 Tage dialysiert. Anschließend wurde die Schockflüssigkeit in einem 100 ml Becherglas tiefgefroren (-20°C) und danach lyophilisiert. Die lyophilisierten Proteine wurden in 2 ml bidest. Wasser gelöst und im Polyacrylamidgelelektrophoresesystem (2.16.) aufgetrennt.

2.18. Konjugationen

Es wurde die "filter-mating" - Methode verwendet. 0,1 ml ÜNK vom Rezipienten und 0,05 ml ÜNK vom Donor wurden in einem sterilen Reagenzglas gemischt und anschließend auf ein steriles Membranfilterplättchen (Schleicher und Schüll) gegeben, das auf einer frischen TY-Platte für 5 Std. im Brutschrank inkubiert wurde. Danach wurde das Filterplättchen in ein Gläschen mit 2 ml Saline gegeben. Die Zellen wurden durch Schütteln auf dem Vortex heruntergewaschen und in der Saline suspendiert. Verschiedene Verdünnungen der Zellsuspension wurden auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und die Platten im Brutschrank inkubiert.

2.19. Isolierung von P1argFCm-lysogenen Stämmen

Die Herstellung der P1argFCm-Lysate und die Infektion der in Frage kommenden Stämme erfolgte analog zur Mutagenese mit dem Phagen Mud1(Ap,lac) (2.10.). Als Ausgangsstämme für die Isolierung der Phagen dienten die Stämme N541 (P1argFCm13) und 1A10 (P1argFCm0). Nach Abstoppen der Phagenadsorption mit 1M Na-Citrat wurden die Zellen in der Christzentrifuge abzentrifugiert (10 Min., 4500 Upm), in 0,05 ml TY-Medium resuspendiert und auf TY-Cm-Platten ausplattiert. Die Platten wurden für 48 Std. bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Proteinmuster der äußeren Membran von E.coli K12-Mutanten

Um einen Überblick über das Proteinmuster der äußeren Membran verschiedener Mutanten zu geben, werden stellvertretend für alle in dieser Arbeit isolierten Membranen in Abbildung 3 die folgenden 6 Typen dargestellt:

I : H1443	(aroB)	IV : ZI373	(aroB, fecD)
II : ZI389	(aroB, ompR)	V : H799	(aroB, fecB)
III: ZI379	(aroB, fecA)	VI : ZI396	(aroB, exbB)

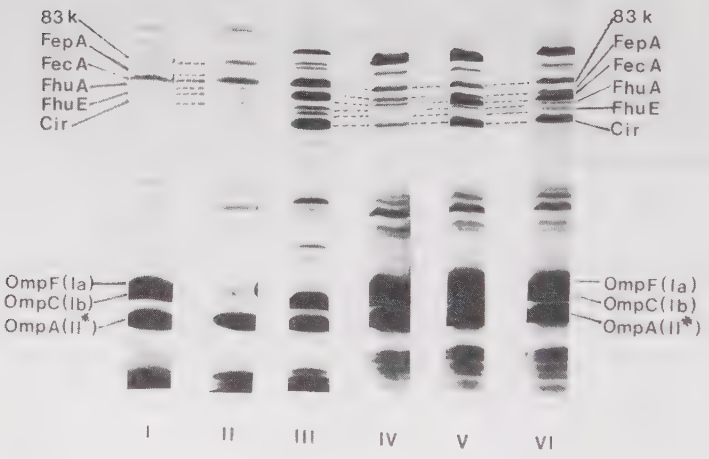
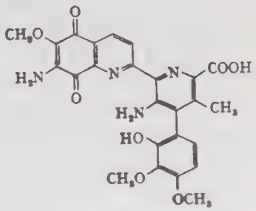


Abb. 3: Proteinmuster der äußeren Membran von 6 E.coli K12-Mutanten nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresesystem.

Die Mutanten wurden in TY-Medium gezüchtet. In diesem Medium ist die Citratkonzentration relativ hoch. Dieses hat zur Folge, daß a.) das Eisencitrat-Transportsystem induziert wird, b.) sich fec Mutanten unter eisenlimitierten Wachstumsbedingungen befinden, da sie den Eisencitratkomplex nicht mehr zur Eisenversorgung verwenden können. Diese Mutanten induzieren infolgedessen alle Eisenkomplexrezeptoren. tonB Mutanten zeigen in TY-Medium den gleichen Membrantyp wie exbB Mutanten (Typ VI). fecD Mutanten besitzen noch den FecA Rezeptor in der äußeren Membran, dieser ist aber nicht mehr induzierbar. Membrantyp II stellt wahrscheinlich eine ompR Mutante dar. Das ompR Gen ist verantwortlich für die Regulation der Expression der beiden Hauptproteine OmpF (Ia) und OmpC (Ib).

3.2. Isolierung von Eisencitrat-Transportmutanten mit Hilfe von Streptonigrin

Streptonigrin ist ein Antibiotikum, das bei E.coli DNS-Strangbrüche verursacht. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen dem intrazellulären Eisengehalt der Bakterienzelle und der bakteriziden Wirkung von Streptonigrin besteht (105,98).



Streptonigrin

In Bakterien, die man unter Eisenmangelbedingungen gezüchtet hatte, war die bakterizide Wirkung von Streptonigrin wesentlich geringer als wenn die Eisenversorgung der Zelle durch Zugabe von Eisenkomplexbildnern (Citrat, Enterochelin, etc.) verbessert wurde. Infolgedessen sollte es auch möglich sein, mit Hilfe von Streptonigrin Mutanten mit einem Defekt im Eisencitrat-Transportsystem anzureichern und zu isolieren.

3.2.1. Bestimmung der Überlebendkeimzahl verschiedener Eisencitrat-Transport-Mutanten nach dem Einwirken von Streptonigrin

Mit diesem Experiment sollte die Sensitivität verschiedener Mutanten im Eisencitrat-Transportsystem gegenüber Streptonigrin bei Wachstum mit Eisencitrat festgestellt werden. Der Versuch wurde nach 2.5.1. durchgeführt. Getestet wurden die folgenden Stämme: AB2847 (aroB), WA380 (aroB, fecA), WA27 (aroB, fecB), H1389 (aroB, exbB), H1452 (aroB, tonB). Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt. Die beiden fec Mutanten und die tonB Mutante zeigten unter diesen Wachstumsbedingungen kaum Sensitivität gegenüber Streptonigrin. Bei der exbB Mutante konnte eine deutlich verringerte Sensitivität festgestellt werden. Beim Stamm AB2847 waren nach 70 Min. fast alle Zellen abgetötet.

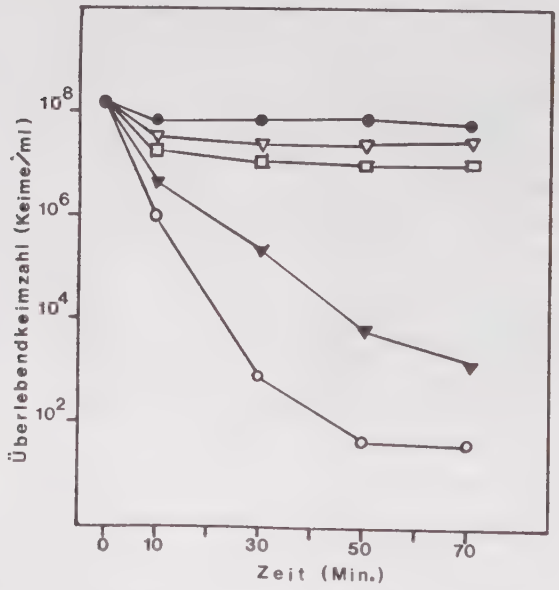


Abb. 4: Sensitivität verschiedener Mutanten gegenüber Streptonigrin während dem Wachstum in M9-Medium mit Citrat als Eisenkomplexbildner. Getestet wurden die Stämme WA380 (●), WA27 (▽), AB2847 (○), H1389 (▼) und H1452 (□). Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie in 2.5.1. beschrieben.

3.2.2. Streptonigrinselektionsplatten für die Isolierung von Eisencitrat-Transport-Mutanten

Als Vorversuch zur Mutantenisolierung wurden auf die in 2.2. beschriebenen Selektionsplatten Verdünnungsausstriche verschiedener Mutanten gemacht um zu testen, ob diese darauf wachsen können. Die Platten wurden 3 Tage inkubiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Wachstum verschiedener Mutanten auf Streptonigrinselektionsplatten

Mutante	Wachstum
WA380 (*aroB*, *fecA*)	+
WA27 (*aroB*, *fecB*)	+
H799 (*aroB*, *fecB*)	+
H1443 (*aroB*)	-
H1290 (*aroB*, *fur*)	- *
H1389 (*aroB*, *exbB*)	+-
H1452 (*aroB*, *tonB*)	+-

+ gutes Wachstum, +- schlechtes Wachstum (kleine Kolonien), - kein Wachstum

*Die Mutante H1290 (*fur*) zeigte auch auf Platten mit der halben Streptonigrinkonzentration kein Wachstum, während der Stamm H1443 darauf Kolonien bilden konnte. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität in *fur* Mutanten hin.

3.2.3. Isolierung von Eisencitrat-Transportmutanten mit Streptonigrin

Aufgrund der in den Vorversuchen 3.2.1. und 3.2.2. erhaltenen Ergebnisse sollte eine direkte Isolierung von Eisencitrat-Transportmutanten mit Streptonigrin möglich sein.

Dies wurde sowohl nach MNNG-Mutagenese als auch nach Mutagenese mit dem Phagen Mud1(Ap,lac) getestet.

A: MNNG-Mutagenese und Streptonigrinselektion

Als Ausgangsstamm diente der Stamm H1443. Mutagenese und Selektion wurden nach 2.13. bzw. 2.5.2. durchgeführt. 100 der entstandenen Kolonien wurden auf Fec-Platten ausgestrichen. 63 davon konnten auf diesen Platten nicht oder nur sehr schlecht wachsen. Von diesen wurden 40 weiter untersucht durch

a) Querstrichtest auf T1- und Albomycinsensitivität (2.9.)
b) Isolierung der äußeren Membran und Auftrennung im Polyacrylamidgel (2.15., 2.16.)
c) Cotransduktion der Mutation mit zag::Tn10 (2.7.)

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 2/A wiedergegeben.

B: Mud1(Ap,lac)-Mutagenese und Streptonigrinselektion

Als Ausgangsstamm wurde ebenfalls der Stamm H1443 verwendet, da dieser lac$^-$ ist und man geeignete lac-Fusionen auf Lac-MacConkey-Platten untersuchen kann. Die Mutagenese und Selektion wurden nach 2.10. bzw. 2.5.2. durchgeführt. Von 100 auf Fec-Platten ausgestrichenen Kolonien konnten 26 nicht oder nur sehr schlecht darauf wachsen. Diese wurden wie in A weiter charakterisiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 2/B wiedergegeben. In diesem Falle konnten nur vier verschiedene Mutantentypen isoliert werden, während das Mutantenspektrum nach MNNG-Mutagenese deutlich größer war. Der Test auf ß-Galactosidaseexpression auf Lac-MacConkey-Platten ergab, daß nur in einer fecB und einer tonB Mutante die ß-Galactosidase exprimiert und unter Eisenmangel induziert wurde. Für diese fecB Mutante (ZI418) konnten annähernd die gleichen ß-Galactosidasewerte wie für den Stamm H799 bestimmt werden (3.4.1.).

Tab. 2: Charakterisierung der streptonigrinresistenten Mutanten nach Mutagenese mit A: MNNG, B: Mud1(Ap,lac)

	Anzahl der Mutanten	Membrantyp	T1-Sens.	Alb-Sens.	Cotransduktion mit zag::Tn10	Mutantentyp
A:	24	I	S	S	-	unbekannt
	2	III	S	S	+	fecA
	2	IV	S	S	+	fecD
	15	V	S	S	+	fecB
	6	VI	R	R	-	tonB
	1	VI	S	R	-	exbB
B:	17	I	S	S	-	unbekannt
	6	V	S	S	+	fecB
	2	VI	R	R	-	tonB
	1	VI	S	R	-	exbB

S=sensitiv, R=resistent

Die Membrantypen sind in Abb. 1 dargestellt (3.1.).

zag::Tn10 läßt sich mit fecA, fecB und fecD cotransduzieren (siehe 3.6.).

3.3. Mutationen, welche die Expression des fecB Gens beeinflußen

Um weitere Erkenntnisse über den Induktionsmechanismus des Fec Systems zu erhalten wurde untersucht, welche Mutationen sich auf die Expression und Induktion des fecB Gens auswirken. Ausgegangen wurde vom Stamm H799 (fecB::Mud1(Ap,lac)). Dieser Stamm bildet auf Lac-MacConkey-Platten rote Kolonien aufgrund der fecB kontrollierten ß-Galactosidaseexpression. Von diesem Stamm abgeleitete Mutanten, die Mutationen tragen welche die fecB Expression beeinflußen, sollten auf diesen Platten eine andere Kolonienfarbe aufweisen. Der Stamm wurde nach 2.13. mit MNNG mutagenisiert. Durch die in 2.6.2. beschriebene Cycloserinbehandlung wurden Mutanten angereichert, welche eine gegenüber dem Ausgangsstamm reduzierte ß-Galactosidaseexpression aufwiesen. 30 weiße bis rosa Kolonien (= reduzierte ß-Galactosidaseexpression) wurden gepickt und hinsichtlich a) äußerer Membran, b) Cotransduktion der Mutation mit zag::Tn10, c) Induktion der ß-Galactosidase durch Citrat untersucht. Für die Bestimmung der Cotransduktion mit zag::Tn10 wurde als Donor der Stamm ZI345 verwendet. Die Transduktanten wurden auf TY-Tet-Amp-Platten selektiert. Anschließend wurden je 50 Transduktanten auf Lac-MacConkey-Amp-Platten ausgestrichen und getestet, ob die Kolonienfarbe der des Ausgangsstammes H799 entsprach. Die Induktion der ß-Galactosidase durch Citrat wurde im Enzymtest nach 2.12. bestimmt. Hierbei wurde die Aktivität des Enzyms von in NB-Medium bzw. in NB-Medium + 1mM Citrat gewachsenen Zellen verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 wiedergegeben. In 8 Mutanten (f,g) war der Mud1(Ap,lac) nicht mehr im fecB Gen sondern an einer anderen Stelle im Chromosom integriert. In diesen Mutanten konnte keine Cotransduktion des Phagen mit zag::Tn10 festgestellt werden. In einem Fall (f) wurde das fecB Gen nach der Transposition des Phagen Mu wieder funktionsfähig. Diese Mutante konnte auf Fec-Platten gut wachsen. 9 Mutanten hatten ver-

	Anzahl Mutanten	äußere Membran (Typ)	Cotransduktion mit zag::Tn10	Kolonienfarbe auf Lac-MacConkey	ß-Galactosidase NB	ß-Galactosidase NB/Cit	Induktion mit Citrat	Mutantentyp
(a)	6	III	30% - 60%	weiß	5	6	-	fecB, fecA
(b)	2	IV	60% - 80%	rosa	35	40	-	fecB, fecD
(c)	4	V	30% - 70%	rosa	25	40	-	fecB, fecC
(d)	1	II	-	rosa	5	50	10x	fecB, ompR
(e)	9	V	-	weiß	-	-	-	fecB, lac^-
(f)	1	I	-	weiß	*		*	$fecB^+$
(g)	7	V	-	weiß bzw. rosa	*		*	fecB
	H799	V	11%	rot	20	250	12x	fecB

Tab. 3: Zusammenfassung der nach MNNG-Mutagenese erhaltenen Mutantentypen in denen die Expression der ß-Galactosdidase im fecB Gen durch zusätzliche Mutationen beeinflußt ist. Die Typen der äußeren Membran sind in 3.1. zusammengefaßt.
* In diesen Mutanten wurden die ß-Galactosidasewerte nicht bestimmt, da keine fecB-Mud1(Ap,lac) Genfusion mehr vorlag.

mutlich einen Defekt im ß-Galactosidase-Strukturgen. In diesen Mutanten konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden (e). In 6 Mutanten (a) fehlte in der äußeren Membran das FecA Rezeptorprotein, in zwei weiteren (b) war das FecA Protein mit Citrat nicht mehr induzierbar. Diese Mutation wurde mit fecD bezeichnet. Ein weiterer Mutantentyp (c) zeichnete sich dadurch aus, daß die Induktion des fecB Gens durch Citrat fehlte, während die fecA Induktion aber intakt war. Diese Mutation wurde mit fecC bezeichnet. Schließlich konnte noch eine Mutante isoliert werden, die eine Mutation im ompR Gen enthielt, dem Gen, das für die Expression der beiden Hauptproteine Ia und Ib notwendig ist.

3.4. ß-Galactosidaseexpression des fecB Gens unter verschiedenen Kulturbedingungen. Einfluß weiterer Mutationen auf die Expression

Durch die Isolierung von Mutanten mit fecB-ß-Galactosidase-Genfusionen wurde es möglich, die Expression des fecB Gens und damit auch die Induktionsbedingungen bzw. den Effekt zusätzlicher Mutationen auf die Expression und Induktion quantitativ zu erfassen.

3.4.1. Expression und Induktion von fecB (A)

Die Experimente wurden mit dem Stamm H799 (fecB::Mud1-(Ap,lac)) durchgeführt. Es wurde untersucht, welchen Einfluß die Zugabe von Citrat bzw. Fluorocitrat zum Medium auf die ß-Galactosidaseexpression hat. Außerdem wurde der Einfluß der Eisenkonzentration im Medium auf die Expression getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4/A wiedergegeben. Durch Zugabe von Citrat bzw. Fluorocitrat zum Medium konnte eine Steigerung der ß-Galacto-

sidaseaktivität um das 15- bis 25-fache erreicht werden. Bei gleichzeitigen Eisenmangelbedingungen war die Induktion noch etwas höher. In eisenreichem Medium betrug sie dagegen nur ca. 30 % vom Maximalwert.

3.4.2. Induktion durch eisenfreies Citrat (B)

In früheren Experimenten (51) wurde gezeigt, daß die Induktion des Fec Systems durch den Eisencitratkomplex und nicht durch eisenfreies Citrat erfolgt. Durch die Zugabe von Desferri-Ferrichrom sollte das im Medium vorhandene Eisen weitgehend komplexiert werden, da Ferrichrom sehr stabile Eisenkomplexe bildet (8). Durch Verwendung einer fhuA Mutante konnte man ausschließen, daß eine gute Eisenversorgung mittels Ferrichrom stattfand und die fec Gene über fur reprimiert wurden. Für die Untersuchung wurde der Stamm ZI395 verwendet, der nach 2.8. vom Stamm H799 isoliert wurde. Die Ergebnisse in Tabelle 4/B zeigen, daß bei Zugabe von Desferri-Ferrichrom zum Medium keine signifikante Induktion der ß-Galactosidase durch Citrat bzw. Fluorocitrat zu messen ist.

3.4.3. fecA Mutation (C)

Die Auswirkung der fecA Mutation auf die fecB Expression wurde insgesamt an 7 verschiedenen Mutanten untersucht (siehe auch 3.3. (a)). Stellvertretend für alle Messungen sind in Tabelle 4/C die Daten für den Stamm ZI325, der durch Transduktion der fecA Mutation in den Stamm H799 entstand, angegeben. Die Expression des fecB Gens bleibt auch nach Zugabe von Citrat bzw. bei gleichzeitigen Eisenmangelbedingungen auf dem gleichen niedrigen Niveau. Dies konnte auch für die anderen untersuchten fecA Mutanten bestätigt werden.

3.4.4. tonB bzw. exbB Mutation (D,E)

tonB und exbB Mutanten zeigen einen defekten Eisencitrat-Transport. Für die Aufklärung des Induktionsmechanismus war es interessant zu testen, ob die beiden Genprodukte auch für die Induktion des Fec Systems notwendig sind. Für die ß-Galactosidasemessungen wurden die tonB und die exbB Mutation mittels P1-Transduktion nach 3.7.3.2. bzw. 3.7.3.3. in den Stamm H799 übertragen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 4/D bzw. 4/E wiedergegeben. Offenbar haben beide Mutationen keinen signifikanten Effekt auf die Expression des fecB Gens.

3.4.5. ompR Mutation (F,G)

In Tabelle 4/F sind die Ergebnisse für die in 3.3.(d) beschriebene ompR Mutante ZI389 wiedergegeben. Die in Tabelle 4/G verwendete Mutante ZI411 wurde nach 2.7.3.4. und P1-Transduktion von lac::Tn5 vom Stamm WA1052 isoliert. Urprünglich wurde angenommen, daß dieser Stamm eine fecB Mutation trägt (93). Transduktionsergebnisse zeigten aber, daß die Mutation nicht neben zag::Tn10 kartiert. Da der Stamm eine stark reduzierte Expression der beiden Hauptproteine Ia und Ib aufweist (93), liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei ebenfalls um eine ompR Mutante handelt. Die ß-Galactosidasemessungen zeigen in beiden Fällen eine 10-fache Induktion der fecB Expression bei Anwesenheit von Citrat. Das Niveau der Expression ist aber in beiden Fällen verringert.

3.4.6. fur Mutation (H)

Die Auswirkung der fur Mutation auf die fecB Expression wurde mit dem Stamm ZI406 getestet. Die Isolierung erfolgte nach 2.7.3.4. mit der fur Mutante H1290 als Ausgangsstamm. Die Ergebnisse in Tabelle 4/H zeigen, daß

in der fur Mutante die fecB Expression schon ohne Citratzugabe wesentlich höher ist als in fur^+ Stämmen. Bei Zugabe von Citrat kann noch eine Induktion um das zwei- bis dreifache erreicht werden.

3.4.7. fecC bzw. fecD Mutation (I,J)

Stellvertretend für die in 3.3. (c) + (d) isolierten fecC bzw. fecD Mutanten sind hier die β-Galactosidasewerte für die Mutanten ZI404 (fecC) und ZI405 (fecD) wiedergegeben. Beide Mutanten sind Abkömmlinge vom Stamm H799 (3.3.). Wie Tabelle 4/I bzw. 4/J zeigt, fehlt in beiden Mutanten die Induktion bei Zugabe von Citrat bzw. bei gleichzeitigen Eisenmangelbedingungen.

3.4.8. Anaerobe Wachstumsbedingungen (K)

In früheren Untersuchungen (51) wurde durch Transportexperimente festgestellt, daß unter anaeroben Bedingungen gewachsene Zellen keine Eisenaufnahme mit Citrat zeigen, bzw. daß das Fec System nicht induziert wird. Diese Ergebnisse sollten auf genetischer Ebene bestätigt werden. Für die Untersuchungen wurde wieder der Stamm H799 verwendet. Die Züchtung unter anaeroben Bedingungen erfolgte nach 2.4.2. Die in Tabelle 4/K wiedergegebenen Werte zeigen, daß unter anaeroben Bedingungen eine ca. 5-fache Induktion durch Citrat, eine ca. 10-fache Induktion bei gleichzeitiger Zugabe von Bipyridin vorliegt.

Tab. 4: ß-Galactosidaseexpression von Mutanten unter verschiedenen Kulturbedingungen.

		Kulturbedingungen	ß-Galactosidase
A:	H799	NB	20
	(*fecB*::Mud1 (Ap,*lac*))	NB/Bip	50
		NB/Cit	250
		NB/Cit/Bip	300
		M9/$FeSO_4$	10
		M9/Bip	30
		M9/$FeSO_4$/Cit	90
		M9/Cit	250
		M9/Cit/Bip	265
		NB/Fluorocit	230
B:	ZI395	NB	22
	(*fhuA*, *fecB*:: Mud1(Ap,*lac*))	NB/Cit/Desf.FC	50
		M9/Cit/Desf.FC	30
		NB/Fluorocit/Desf.FC	35
C:	ZI325	NB	4
	(*fecA*, *fecB*:: Mud1(Ap,*lac*))	NB/Cit	7
		NB/Cit/Bip	6
D:	ZI342	NB	20
	(*tonB*, *fecB*:: Mud1(Ap,*lac*))	NB/Cit	190
		NB/Cit/Bip	230
E:	ZI341	NB	25
	(*exbB*, *fecB*:: Mud1(Ap,*lac*))	NB/Cit	210
		NB/Cit/Bip	275
F:	ZI389	NB	5
	(*ompR*, *fecB*:: Mud1(Ap,*lac*))	NB/Cit	50
		NB/Cit/Bip	85

Fortsetzung von Tab. 4

		Kulturbedingungen	ß-Galactosidase
G:	ZI411 (ompR, fecB::Mud1(Ap,lac))	NB	10
		NB/Cit	110
		NB/Cit/Bip	160
H:	ZI406 (fur, fecB::Mud1(Ap,lac))	NB	120
		NB/Cit	270
		NB/Cit/Bip	295
I:	ZI404 (fecC, fecB::Mud1(Ap,lac))	NB	35
		NB/Cit	40
		NB/Cit/Bip	45
J:	ZI405 (fecD, fecB::Mud1(Ap,lac))	NB	25
		NB/Cit	40
		NB/Cit/Bip	45
K:	H799 (fecB::Mud1 (Ap,lac))	NB (anaerob)	12
		NB/Cit (anaerob)	60
		NB/Cit/Bip (anaerob)	140

Die Bestimmung der ß-Galactosidaseexpression wurde nach 2.12. durchgeführt. Ausgegangen wurde von TY-ÜNK. Die Zugabe von Bipyridin erfolgte erst 2 Std. nach dem Animpfen des Mediums. Nach 3 Std. und 5 Std. Wachstum in dem entsprechenden Medium wurden Zellproben zur Bestimmung der ß-Galactosidaseaktivität entnommen. In der Tabelle ist der Mittelwert aus beiden Werten angegeben. Die verwendeten Konzentrationen der Medienzusätze waren: Bipyridin (Bip): 100µM / Citrat (Cit): 1mM / $FeSO_4$: 100µM / Fluorocitrat: 1mM / Desferri-Ferrichrom (Desf.FC): 50µM

3.5. Versuch zur Isolierung von fecA::Mud1(Ap,lac) Mutanten mit regulierbarer ß-Galactosidase-expression

In den vorausgegangenen Versuchen wurde gezeigt, daß die Expression und Induktion des fecB Gens abhängig ist von der Anwesenheit eines intakten fecA Gens. Wie aber sieht es mit der Expression des fecA Gens selbst aus? Um dies zu testen wurden mehrere Versuche durchgeführt, um fecA::Mud1(Ap,lac) Mutanten mit regulierbarer ß-Galactosidase-expression zu erhalten. Als Ausgangsstämme wurden die Stämme H455, ZI367 und H1443 verwendet. Die Mutagenese erfolgte nach 2.10. Vor der Selektion mit Streptonigrin (2.5.2.) wurde eine Cycloserinanreicherung (2.6.) durchgeführt. Von insgesamt 57 auf Fec-Platten nicht wachsenden Mutanten wurden die äußeren Membranen isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurden tonB und exbB Mutanten aufgrund ihrer Albomycinresistenz ausselektiert. 11 der untersuchten Mutanten zeigten kein FecA Protein mehr. Es konnte aber in keinem Fall eine ß-Galactosidaseexpression festgestellt werden. Durch Cotransduktionsexperimente mit zag::Tn10 wurde sichergestellt, daß der Phage Mud1(Ap,lac) im oder in der Nähe des fecA Gens integriert war.

3.6. Transduktionsexperimente zur genaueren Kartierung der fec Genregion

Durch die Isolierung weiterer Mutanten im Eisencitrat-Transportsystem wurde es möglich, eine genauere Kartierung der fec Genregion durchzuführen. Durch die folgenden Experimente sollte die Reihenfolge der verschiedenen Marker im fec Genbereich bei 7 Min. auf der Genkarte von E.coli K12 (1) festgestellt werden. Dazu wurde die Cotransduktionshäufigkeit bestimmter Marker nach

2.7. bestimmt. Die P1-Lysate wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung verwendet. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Es wurden jeweils 100 Transduktanten hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht. Für die Transduktionsexperimente mit dem argF Marker wurde als Rezipient eine argF, argI Doppelmutante verwendet, da beide Gene für das gleiche Enzym (Ornithin-Transcarbamylase) codieren. Das Gen argI kartiert bei 96 Min. auf dem E.coli K12 Chromosom (1), so daß man eine Cotransduktion mit den fec Genen ausschließen konnte. Die Anwesenheit von fecC und fecD (V,VI) wurde durch Ausstreichen der Transduktanten auf Lac-MacConkey-Platten festgestellt. Bei Anwesenheit der beiden Genprodukte zeigten die Transduktanten den Lac Phänotyp des Ausgangsstammes H799 (siehe auch 3.3.). Bei der Transduktion II konnte man die $fecA^+$ Transduktanten aufgrund ihres Wachstums in zwei Gruppen einteilen. Ein Teil zeigte auf Fec-Platten das gleiche Wachstum wie der Donorstamm ZI345, der andere Teil (18 % davon) konnte dagegen nur schlecht darauf wachsen. Eine Untersuchung der äußeren Membran dieser beiden Typen ergab, daß bei den schlecht wachsenden Transduktanten das FecA Protein offenbar nicht mehr induziert werden konnte (Membrantyp IV, fecD), während die gut wachsenden Transduktanten ein fec^+ Membranmuster (Membrantyp I) zeigten.
In weiteren Transduktionsexperimenten, die in Tabelle 5 nicht aufgeführt sind wurde festgestellt, daß keine Cotransduktion von fecB mit argF bzw. von fecA, fecB und zag::Tn10 mit sowohl proA,B als auch lac erfolgt.

Tab. 5: Cotransduktionshäufigkeiten von Markern in der *fec* Genregion

	P1-Transduktion Donor	Rezipient	Selektions-platten	Test auf	Cotransduktions-häufigkeit	
I:	ZI345 (*zag*::Tn*10*)	WA27 (*fecB*)	TY-Tet	*fec*$^+$	*fecB*, *zag*::Tn*10*	63 %
II:	ZI345	WA380 (*fecA*)	TY-Tet	*fec*$^+$	*fecA*, *zag*::Tn*10*	50 %
III:	ZI345	H799 (*fecB*::Mud1(Ap,*lac*)	TY-Tet	*fec*$^+$	*fecB*, *zag*::Tn*10*	11 %
IV:	ZI345	ZI379 (*fecA*::Mud1(Ap,*lac*)	TY-Tet	*fec*$^+$	*fecA*, *zag*::Tn*10*	5 %
V:	ZI345	ZI404 (*fecC*, *fecB*::Mud1(Ap,*lac*)	TY-Tet-Amp	*fecC*$^+$	*fecC*, *zag*::Tn*10*	70 %
VI:	ZI345	ZI405 (*fecD*, *fecB*::Mud1(Ap,*lac*)	TY-Tet-Amp	*fecD*$^+$	*fecD*, *zag*::Tn*10*	80 %
VII:	ZI345	PC0950 (*argI*, *argF*)	TY-Tet	*argF*$^+$	*argF*, *zag*::Tn*10*	14 %
VIII:	WA380	ZI407 (*aroB*, *argI*, *argF*)	M9 ohne Arginin	*fec*$^-$	*fecA*, *argF*	8 %

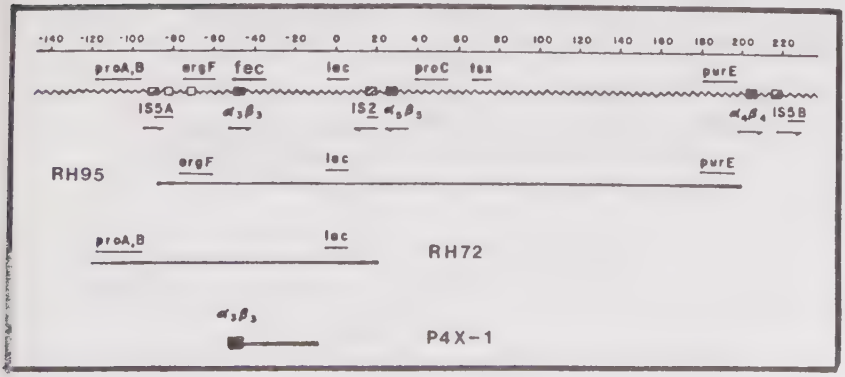
Der Test auf *argF*$^+$ wurde auf M9-Platten, der auf *fec*$^+$ auf Fec-Platten durchgeführt.
Der Test auf *fecC* bzw. *fecD* erfolgte auf Lac-MacConkey-Platten wie zuvor beschrieben.

3.7. Komplementationsversuche mit rekombinanten Plasmiden und P1-Phagen

Die in 3.3. und 3.4. erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß für die Induktion des fecB Gens durch Citrat ein intaktes fecA Gen und noch weitere Genbereiche (fecC, fecD) notwendig sind. Mit Hilfe von Komplementationsstudien sollte es möglich sein, genauere Informationen über die Anzahl der an der Induktion beteiligten Gene zu erhalten bzw. zu untersuchen, auf welcher Ebene die Gene in den Induktionsmechanismus eingreifen. Für Komplementationsuntersuchungen benötigt man Plasmide oder Phagen, welche den zu komplementierenden Genbereich tragen. Deshalb wurden mehrere F'-Plasmide, die benachbarte Gene der fec Genregion tragen, in dieser Hinsicht untersucht. Zusätzlich wurden rekombinante P1-Phagen, welche den argF Genbereich tragen getestet.

Um eine genauere Vorstellung über die fec Genregion zu erhalten, ist in Abbildung 5 die physikalische Karte des entsprechenden chromosomalen Genbereichs wiedergegeben.

Abb. 5: Physikalische Karte der chromosomalen Genregion zwischen 5,5 und 9 Min. mit ungefährer Lage bekannter Gene und IS-Elemente (31). Die Zahlen über der Karte geben die Abstände von der EcoRI-Schnittstelle im lacZ Gen in kb an. Darunter sind die chromosomalen Genbereiche von 3 genauer charakterisierten F'-Plasmiden abgebildet.



3.7.1. Komplementationsversuche mit F'-Plasmiden

Für die Komplementationsversuche wurden verschiedene F'-Plasmide durch Konjugation in fec Mutanten überführt. Dabei wurden sowohl die fecA Mutante ZI311 als auch die fecB Mutante ZI370 als Rezipienten verwendet. Die beiden Stämme wurden nach MNNG-Mutagenese und Streptonigrinselektion isoliert (siehe 3.2.3.). Anschließend wurde die recA Mutation nach 2.7.3.1. in die beiden Stämme transduziert um eine Übertragung der fec Gene durch Hfr-Bildung und Rekombination auszuschließen. Im einzelnen wurden folgende Stämme (Plasmide) getestet:

286 (F'lac, pro)	TM-1 (F'lac, proAB)
C600 (F'lac)	MXR (F'lac, proAB, Mu18A-1)
RH95 (F'lac, purE)	RH72 (F'lac, proA) = (F'128)
P4X-1 ($F'\Psi_3\beta_3$)	

Die Konjugationen wurden nach 2.18. durchgeführt. Selektiert wurde auf die Phänotypen Fec^+ bzw. Lac^+ auf Fec-Tet-Platten oder M9-Platten mit Lactose als C-Quelle. Bei Konjugationen mit dem Plasmid P4X-1 wurde nur auf Fec-Platten selektiert, da dieses Plasmid die lac Gene nicht trägt. Die Selektion auf Fec-Platten verlief in allen Fällen erfolglos, was man so interpretieren kann, daß durch kein Plasmid die fec Mutation im Rezipienten komplementiert werden konnte. Die lac^+ Selektion hatte dagegen Erfolg. Zur Kontrolle wurden 10 lac^+ Konjuganten von jedem Plasmid auf Fec-Platten ausgestrichen. Auch in diesem Fall konnten die Konjuganten darauf nicht wachsen. Die lac Mutation konnte durch das übertragene Plasmid zwar komplementiert werden, die fec Mutation aber nicht.

3.7.2. Komplementationsversuche mit lysogenen P1argFCm-Phagen

Die argF Genregion in E.coli K12 ist flankiert von 2 IS1-Elementen (siehe Abbildung 5,□). Dadurch war es möglich, diesen 11 kb großen Genabschnitt IS1-argF-IS1 auf einen lysogenen P1-Phagen zu bringen. Die Insertion der Genregion in den Phagen erfolgt durch eine ortsspezifische Rekombination mit dem IS1-Element, das im P1-Phagengenom vorhanden ist. Durch M.York et al (106,50) wurden mehrere solcher P1argFCm-Phagen isoliert. Diese Phagen tragen zusätzlich noch ein Gen für Chloramphenicolresistenz. Da frühere Experimente gezeigt haben, daß fecA in der Nähe von argF kartiert (siehe auch 3.6.), sollte nun untersucht werden, ob sich die fec Genregion innerhalb der 11 kb Insertion der P1argFCm-Phagen befindet. Dazu wurden zwei fec Mutanten (WA380,WA27) und eine argF Mutante (PC0950) mit zwei verschiedenen P1argFCm-Phagen aus den Stämmen N541 und 1A10 nach 2.19. lysogenisiert. Von beiden fec Stämmen wurden jeweils 50 P1argFCm-lysogene Mutanten auf Wachstum mit Citrat als Eisenkomplexbildner getestet. In keinem Fall konnte Wachstum auf Fec-Platten festgestellt werden, d.h. die fec Mutation wurde nicht komplementiert. Zur Kontrolle wurden die lysogenen argF Mutanten auf M9-Platten ohne Argininzusatz ausgestrichen. Alle Mutanten zeigten darauf Wachstum. Die lysogenen P1-Phagen trugen offensichtlich noch die argF Insertion.

3.8. Isolierung periplasmatischer Proteine induktionsdefekter Mutanten

Mutanten im fecD Gen fehlt die Induktion des Fec Systems durch Eisencitrat. Welche Rolle das Gen im Induktionsmechanismus spielt ist noch unklar. Man könnte sich aber vorstellen, daß das fecD Genprodukt eine Vermittlerrolle zwischen dem an den Rezeptor gebundenen Eisencitratkom-

plex und der DNS spielt. Hierbei könnte es sich z.B. um ein periplasmatisches Protein handeln. Um dies zu testen, wurden die periplasmatischen Proteine von zwei induktionsdefekten Mutanten isoliert und im SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem aufgetrennt um eine eventuelle Veränderung im Proteinmuster zu sehen. Untersucht wurden die beiden fecD Mutanten ZI405 und ZI373. Als Kontrollstämme wurden die beiden Stämme H1443 (Ausgangsstamm von ZI405) und AB2847 (Ausgangsstamm von ZI373) verwendet. Die Isolierung der periplasmatischen Proteine wurde nach 2.17. durchgeführt. Die Zellen wurden in TY-Medium + 100µM Bipyridin gezüchtet. In Abbildung 6 ist das Ergebnis dargestellt. In den induktionsdefekten Mutanten fehlt keine

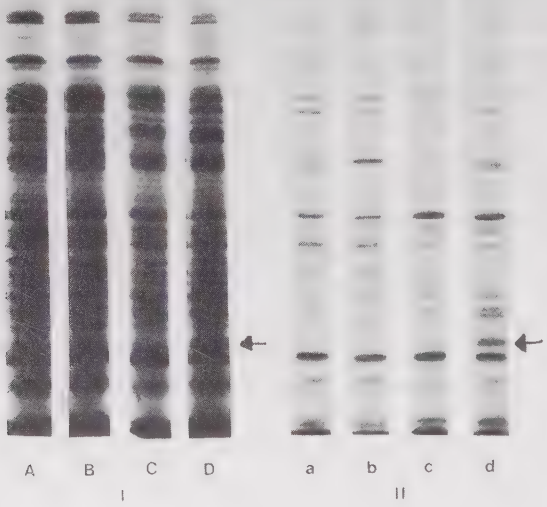


Abb. 6: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von periplasmatischen Proteinen. Die Zellen wurden in TY-Medium + 100µM Bipyridin gezüchtet. Es wurden jeweils 50 µl (I) bzw. 10 µl (II) aufgetragen. Die 50 µl Proben wurden lyophilisiert und danach in 10 µl bidest. Wasser resuspendiert. Im einzelnen wurden die Proteine folgender Stämme aufgetragen: A(a) : AB2847 B(b) : ZI373 C(c) : H1443 D(d) : ZI405

periplasmatische Proteinbande im Vergleich zu den Ausgangsstämmen. In der Mutante ZI405 ist eine zusätzliche Proteinbande zu sehen (←). Bei gleichzeitigem Auftragen äußerer Membranproteine wurde festgestellt, daß die Bande ungefähr auf der Höhe des OmpA Proteins läuft.

4. DISKUSSION

4.1. Isolierung von Eisentransportmutanten mit Hilfe von Streptonigrin

Die in der Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen deutlich, daß eine Korrelation zwischen der Eisenversorgung der E.coli-Zelle und der Wirkung von Streptonigrin besteht. Je besser die Eisenversorgung stattfindet, um so effektiver ist die lethale Wirkung des Streptonigrins. Dieses Antibiotikum stellt daher ein geeignetes Mittel für die Selektion von Eisentransportmutanten dar. Für den Fall des Eisencitrattransportsystems wurde dies in 3.2.3. erfolgreich durchgeführt. Gerade für dieses System stellt diese Methode eine große Hilfe dar, da im Gegensatz zu anderen Eisentransportsystemen keine Colicine bzw. Phagen bekannt sind, die den FecA Rezeptor zur Adsorption verwenden und die man dadurch zur Selektion von Rezeptormutanten verwenden könnte. Frühere Isolierungen von fec Mutanten waren relativ mühselig, da eine direkte Selektion nicht durchgeführt werden konnte (93). Mit Hilfe von Streptonigrin wird die Mutantenisolierung vereinfacht. Dadurch wurde es auch möglich, ein größeres Spektrum unterschiedlicher Eisencitrattransportmutanten zu isolieren, die für die Aufklärung der am System beteiligten Gene bzw. deren Reihenfolge auf dem E.coli Chromosom notwendig sind. Die erhaltenen Mutantentypen differieren stark, abhängig von der Art des verwendeten Mutagens. Für den Fall der Mu-Mutagenese könnte man vermuten, daß dieser Phage sog. "hot spots" besitzt, Stellen in der Bakterien-DNS, an denen er bevorzugt integriert. Um ein möglichst großes Spektrum an Mutanten zu erhalten, sollte man daher verschiedene Mutagene verwenden.
Für die Isolierung von Mutanten im Aerobactinsystem wurde die Streptonigrinselektion ebenfalls schon mit Erfolg

angewendet.(11). Im Prinzip sollte die Methode auch für alle anderen Eisentransportsysteme anwendbar sein. Wichtig dabei ist, die Selektionsbedingungen so zu wählen, daß die Transportmutanten unter starkem Eisenmangel stehen, während bei den übrigen Bakterien eine gute Eisenversorgung stattfindet damit das Streptonigrin wirken kann. Für fur Mutanten konnte gezeigt werden, daß diese sensitiver gegen Streptonigrin sind als fur^+ Stämme. Hier reicht eine geringere Streptonigrinkonzentration im Medium aus zur Abtötung der Bakterien. Durch die konstitutive Expression der Eisentransportsysteme liegt in diesen Mutanten eine bessere Eisenversorgung vor, was zu einer höheren Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum führt.
Wie das Eisen die bakterizide Wirkung des Streptonigrins beeinflußt ist noch unklar. Den Wirkungsmechanismus des Antibiotikums stellt man sich folgendermaßen vor: Durch dessen Autoxidation werden die aktiven Sauerstofformen Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($OH\cdot$) gebildet (44,48,85). Diese reagieren mit der DNS und führen zu Strangbrüchen (98,105). Für Eisen ist bekannt, daß es die Bildung von Hydroxylradikalen aus Superoxid und Wasserstoffperoxid katalysiert (74). Vielleicht erklärt dies die Notwendigkeit von Eisen für die bakterizide Wirkung von Streptonigrin.

4.2. FecB Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen

Mit Hilfe der Genfusionstechnik wurde es möglich, quantitative Aussagen über die Expression von fecB in Abhängigkeit verschiedener Kulturbedingungen zu machen. Bei Anwesenheit von Eisencitrat erfolgt eine 10- bis 20-fache Induktion der fecB Expression. Bei gleichzeitiger Zugabe des Eisenkomplexbildners Bipyridin konnte nur noch eine geringe Steigerung der Expression erreicht werden. Da so-

wohl in M9- als auch in NB-Medium die Eisenkonzentration relativ gering ist, stehen fec Mutanten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Citrat unter Eisenmangelbedingungen, da diese das vom Citrat komplexierte Eisen nicht mehr aufnehmen können. Die Isolierung von äußeren Membranen so inkubierter fec Mutanten zeigt, daß alle Eisenkomplexrezeptoren induziert sind. Dies kann auch in TY-Medium beobachtet werden (siehe 3.1.). Bei Vorliegen einer hohen Eisenkonzentration im Medium kann man eine wesentlich geringere Induktion durch Citrat messen. Dies bestätigt die Hypothese, daß neben der Citrat-Induktion noch eine weitere Regulation des Fec Systems durch die intrazelluläre Eisenkonzentration existiert. Bei hohen Eisenkonzentrationen im Medium gelangt das Eisen über ein Niederaffinitätssystem in die Zelle, wo es wahrscheinlich in Zusammenarbeit mit dem fur Genprodukt die Expression der fec Gene bzw. aller Eisentransportgene verhindert.

Auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen läßt sich eine Induktion des fecB Gens durch Citrat messen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Untersuchungen, in denen unter anaeroben Bedingungen gewachsene Zellen keine Eisenaufnahme mit Citrat aufwiesen (51). Eine Induktion der Eisencitrat-Transportkomponenten sollte jedoch auch eine messbar höhere Eisenaufnahme bewirken. Für die Gene fepA, fhuA, cir und tonB konnte in früheren Untersuchungen ebenfalls eine Induktion unter anaeroben Bedingungen nach Zugabe von Bipyridin gemessen werden (38). Die Gesamtexpression war ca. 50 % niedriger als unter aeroben Wachstumsbedingungen. In fur Mutanten wurde (mit Ausnahme des fepA Gens) keine signifikante Induktion mehr unter diesen Bedingungen gemessen. Diese Mutanten zeigten schon in eisenreichem Medium maximale Genexpression. Da das Fec System ebenfalls der fur Kontrolle unterliegt (siehe 3.4.6.) kann die Induktion unter anaeroben Bedingungen mit diesem

Regulationsmechanismus erklärt werden. Auch hier liegt die Gesamtexpression ca. 50 % niedriger als unter aeroben Bedingungen. Bei Zugabe von Citrat wurde eine fünffache Induktion der fecB Expression gemessen. Diese vergleichsweise niedrige Induktion könnte durch eine bessere Eisenversorgung der Zelle erklärt werden. Unter anaeroben Bedingungen dominiert der Anteil an besser löslichen Fe^{2+}-Ionen. Zudem ist die Affinität von Citrat zu diesen Eisenionen geringer. Dadurch ist die Konzentration an freien Eisenionen erhöht, die über im Detail noch unbekannte Transportmechanismen in die Zellen gelangen.
Bei gleichzeitiger Zugabe von Bipyridin und Citrat konnte eine höhere Induktion der fecB Expression gemessen werden. Da Bipyridin Fe^{2+}-Ionen komplexiert, kommt es zu Eisenmangelbedingungen für die Zelle, was zur maximalen Induktion des Fec Systems führt.

In Übereinstimmung zu früheren Untersuchungen (51) konnte eine Induktion des fecB Gens durch 1mM Fluorocitrat nachgewiesen werden. Wie damals schon beobachtet, zeigte Fluorocitrat keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Zellen. Da nach dessen Aufnahme ins Cytoplasma eine Hemmung des Citronensäurezyklus zu erwarten wäre, erfolgt die Induktion vermutlich von anderen Zellkompartimenten, z.B. dem Periplasma aus. Mit Hilfe von Fluorocitrat konnte keine Eisenaufnahme gemessen werden (51), was ein Hinweis dafür ist, daß die Induktion des Fec Systems unabhängig vom Eisencitrattransport verläuft.

Die Induktion von fecB wird durch den Eisencitrat- bzw. Eisenfluorocitrat-Komplex hervorgerufen. Durch die Komplexierung des im Medium vorhandenen Eisens mit Hilfe von Desferri-Ferrichrom kann keine signifikante Steigerung der β-Galactosidaseexpression bei Zugabe von Citrat festgestellt werden.

4.3. Einfluß weiterer Mutationen auf die fecB Expression

Für die Induktion von fecB durch den Eisencitratkomplex ist wahrscheinlich das FecA Rezeptorprotein notwendig. FecA Mutanten zeigen eine sehr geringe fecB Expression, eine Induktion durch Citrat bzw. bei gleichzeitigen Eisenmangelbedingungen ist nicht mehr nachweisbar. Hierfür könnte man mehrere Erklärungen geben. Auf genetischer Ebene kann die Mutation im fecA Gen einen polaren Effekt auf die Expression des fecB Gens ausüben, wenn man davon ausgeht, daß beide Gene den gleichen Promotor haben. Gegen diese Überlegungen sprechen allerdings die in 3.6. erhaltenen Kartierungsergebnisse. Bei gemeinsamem Promotor von fecA und fecB sollte die zag::Tn10 Mutation ebenfalls einen Effekt auf die Expression von fecB ausüben, da das Tn10 zwischen den beiden fec Genen kartiert. Dies konnte aber nicht beobachtet werden. Eine weitere denkbare Erklärung wäre die Präsenz eines zusätzlichen Gens, das notwendig ist für die Induktion und Expression von fecA und fecB. Bei dessen Mutation würde keine Transkription der fec Strukturgene mehr stattfinden. Die entsprechenden Mutanten wären phänotypisch nicht von fecA Strukturgen-Mutanten zu unterscheiden. Dieses hypothetische Gen müßte aufgrund der in 3.3.(a) erhaltenen Kartierungsergebnisse in der Nähe von zag::Tn10 kartieren, sein Genprodukt könnte z.B. ein Aktivator des Fec Systems sein. Der wahrscheinlichste Fall ist aber, daß das FecA Rezeptorprotein notwendig ist um eine Induktion der fec Gene einzuleiten. Dafür sprechen auch die in 3.5. erhaltenen Ergebnisse. Trotz mehrerer Versuche konnten keine fecA::Mud1(Ap,lac) Mutanten mit regulierbarer ß-Galactosidaseexpression isoliert werden. Es ist relativ unwahrscheinlich, daß der Phage Mud1(Ap,lac) in allen 11 Mutanten in falscher Orientierung ins fecA Gen integriert ist. Wenn man ausschließt, daß die fecA Genregion aus irgendwelchen Gründen die Integrationsrichtung des Phagen Mu bzw. die ß-Galactosidaseexpression beeinflußt, liegt

die Vermutung nahe, daß eine Expression des fecA Gens nur bei Anwesenheit eines intakten FecA Genproduktes erfolgt. Die in 3.5. erhaltenen Ergebnisse sprechen gleichzeitig gegen die zuvor diskutierte Möglichkeit, daß eine Mutation in einem zusätzlichen Induktionsgen den gleichzeitigen Ausfall von fecA und fecB verursacht. In diesem Fall sollte es möglich sein, induzierbare fecA Fusionsmutanten zu isolieren.

Die Genprodukte von tonB und exbB sind am Induktionsprozess des Eisencitrattransportsystems nicht beteiligt. Die in 3.4.4. bestimmten ß-Galactosidasewerte für beide Mutanten zeigen keine signifikante Abweichung gegenüber dem Ausgangsstamm. Die etwas niedrigeren Werte kann man villeicht mit dem äußerst schlechten Wachstum dieser Stämme im Testmedium erklären. Da tonB und exbB Mutanten eine starke Reduktion der Eisenaufnahme mittels Citrat zeigen (8), sollte bei Beteiligung der beiden Genprodukte am Induktionsprozess eine erhebliche Expressionsverringerung des fecB Gens zu messen sein. Zudem zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Membranisolierungen, daß sowohl tonB als auch exbB Mutanten ein induzierbares FecA Rezeptorprotein aufweisen (vergl. 3.1./VI). Die Genprodukte von tonB, exbB und sehr wahrscheinlich auch exbC (11) muß man daher wohl als spezifische Komponenten des Transportsystems von Eisencitrat ansehen.

Eine Mutation im ompR Gen beeinflußt die Expression des fecB Gens. Das Gen kartiert bei 74 Min. auf dem E.coli Chromosom, dicht neben dem Gen envZ (32,33,78,91). Beide Gene sind verantwortlich für die Regulation der Expresion der beiden Hauptproteine OmpF (Ia) und OmpC (Ib). OmpR Mutanten können zwei verschiedene Phänotype aufweisen: entweder es fehlen beide Hauptproteine, oder aber es fehlt nur OmpC. Im envZ Mutanten fehlt das Protein OmpF. Das OmpR Genprodukt ist verantwortlich für die positive

Regulation der Transkription von ompF und ompC (Strukturgene für die beiden Hauptproteine). Nur bei dessen Anwesenheit werden diese Gene exprimiert. Die Rolle des envZ Gens ist noch nicht genau bekannt. In einer früheren Arbeit (71) wurde festgestellt, daß in envZ Mutanten (damals noch perA Mutanten) die Eisenkomplexrezeptoren Cir (74K), FepA (81K) und Fiu (83K) reduziert vorliegen. Da die Bakterienstämme damals in M9-Medium ohne Citratzusatz gezüchtet wurden, konnte man über FecA diesbezüglich keine Aussage machen. In einer weiteren Arbeit (96) fand man, daß die envZ Mutation zur Reduktion verschiedener periplasmatischer Proteine führt.
Die hier gefundene reduzierte fecB Expression in ompR Mutanten könnte man sich folgendermaßen erklären: In den untersuchten Mutanten sind die beiden Gene ompR und envZ mutiert (z.B. durch eine Deletion im entsprechenden Genbereich). Durch die envZ Mutation liegt der FecA Rezeptor reduziert in der äußeren Membran vor und kann daher die Induktion des fecB Gens durch Eisencitrat nicht mehr so effektiv einleiten. Weiterhin wäre denkbar, daß in envZ Mutanten ein periplasmatisches Protein vermindert vorliegt, welches am Induktionsprozess beteiligt ist. Ein direkter Effekt der Mutation auf die Transkription des fecB Gens kann man auch nicht ausschließen.
Für die Hypothese, daß die envZ Mutation die eigentliche Ursache für die reduzierte fecB Expression ist spricht, daß in einer früheren Arbeit (93) mehrere Mutanten isoliert wurden, in denen das Protein OmpF reduziert in der äußeren Membran vorlag. Diese Mutanten wurden damals als fecB eingestuft, da sie fast kein Wachstum mit Eisencitrat zeigten. Für die Stämme WA9215 und WA10123 konnte gezeigt werden, daß keine Cotransduktion der Mutation mit zaq::Tn10 vorliegt, daß es sich somit wahrscheinlich nicht um fecB, sondern envZ Mutanten handelt.
Auf welche Weise die envZ Mutation die Menge an Eisenkomplexrezeptoren reduziert ist noch unklar. Ob dies auf der Ebene der Transkription erfolgt könnte man mit Hilfe der Genfusionstechnik feststellen. Zum Beispiel

sollte dann in fiu::Mud1(Ap,lac), envZ Doppelmutanten eine reduzierte ß-Galactosidaseexpression zu messen sein. Wirkt das Genprodukt dagegen posttranskriptional, z.B. bei der Integration der Proteine in die äußere Membran, sollte man keinen Effekt auf die Genexpression erwarten (mit Ausnahme der fec Gene!). Experimente mit ompF Mutanten zeigten, daß hier die Menge an Eisenkomplexrezeptoren normal ist. Das Fehlen des OmpF Proteins ist daher nicht als Ursache anzusehen (71).
Die Menge an OmpC bzw. OmpF in der äußeren Membran wird stark durch das Wachstumsmedium beeinflußt. Zum Beispiel wurde gezeigt, daß bei hohem osmotischen Wert bevorzugt das Protein OmpC vorliegt. Da man aus den bisher erhaltenen Ergebnissen schließen muß, daß ein gemeinsames Regulationssystem für Eisenkomplexrezeptoren und den Hauptproteinen OmpF und OmpC vorliegt, ist es interessant zu untersuchen, welchen Einfluß unterschiedliche Wachstumsmedien auf die Menge der einzelnen Membranproteine ausüben. Insbesondere sollte der Einfluß der Eisenkonzentration auf die Menge an vorliegendem OmpF bzw. OmpC und der Einfluß des osmotischen Wertes auf die Menge an vorliegenden Eisenkomplexrezeptoren untersucht werden. Experimente in dieser Richtung werden zur Zeit durchgeführt (H.Rotering, persönliche Mitteilung).

Das Fec System wird neben der Citratinduktion durch den Eisengehalt der Zelle reguliert. In fur Mutanten kommt es zu einer Dereprimierung der fec Genexpression. Zusätzlich wird aber auch in diesen Mutanten Citrat für die Induktion benötigt (3.4.6.). Hier reicht aber eine um den Faktor 10 geringere Konzentration im Medium aus (38). Im citratarmen NB-Medium kann man daher eine höhere fecB Expression messen (Tabelle 4/H). Das Expressionsniveau in eisenlimitiertem Medium mit Citratzusatz ist vergleichbar mit dem in fur^+ Stämmen. Unter diesen Bedingungen liegt offenbar eine konstitutive Expression des fecB Gens vor.

fecC Mutanten zeigen keine Induktion der fecB Expression bei Zugabe von Citrat (Tabelle 4/I). Die fecA Induktion scheint dagegen intakt zu sein. Da die Mutation nur die Transkription des fecB Gens beeinflußt, könnte man fecC als Teil des fecB Operons ansehen. Dies kann z.B. der Operator sein, an dem die Induktion des fecB Strukturgens bei Anwesenheit von Eisencitrat durch einen Aktivator erfolgt. Der Operator erlaubt noch ein Grundniveau an fecB Expression, die Zugabe von Citrat bewirkt jedoch keine Induktion des Systems mehr. Ein Defekt in der fur Regulation (z.B. ein Fehlen der Dereprimierung) scheint in diesen Mutanten nicht vorzuliegen, da unter Eisenmangel alle Eisenkomplexrezeptoren induziert in der äußeren Membran vorliegen.

In fecD Mutanten fehlt die Citratinduktion der beiden Gene FecA und fecB. Da, wie zuvor diskutiert, wahrscheinlich kein gemeinsamer Operator für die beiden Gene existiert, stellt das FecD Genprodukt vermutlich eine Proteinkomponente des Induktionssystems dar. Hierbei könnte man z.B. an ein periplasmatisches Protein denken, welches bei Anwesenheit des Eisencitratkomplexes die Information für die Induktion des Systems weiterleitet. Diese Hypothese wurde für 2 fecD Mutanten untersucht (3.8.). Hierbei konnte jedoch kein Fehlen eines periplasmatischen Proteins festgestellt werden. Die in Mutante ZI405 gefundene zusätzliche Proteinbande auf der Höhe des OmpA-Proteins kann durch Mehrfach-Mutationen, die nach MNNG-Mutagenese häufig beobachtet werden, entstanden sein. Um genauere Aussagen diesbezüglich zu machen, müßten weitere fecD Mutanten hinsichtlich der periplasmatischen Proteine untersucht werden.
Als FecD Genprodukt könnte man sich auch ein Transcytoplasmamembran-Protein vorstellen. Durch Kontakt mit dem Induktor Eisencitrat im periplasmatischen Raum kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins an der Innenseite der Cytoplasmamembran, was wiederum direkt oder

über weitere Komponenten zur Induktion der fec Genexpression führt. Ein solcher Mechanismus wird z.B. für die Induktion von außen durch Glukose-6-Phosphat angenommen (90). Weiterhin wäre denkbar, daß FecD einen cytoplasmatischen Aktivator darstellt, der bei Anwesenheit von Eisencitrat an die Operatorregion der fec Gene bindet und die Expression induziert.
Welche der drei genannten Möglichkeiten für das fecD Gen vorliegt, kann nicht beantwortet werden. Denkbar ist, daß mehrere davon im Induktionsmechanismus des Eisencitratsystems verwirklicht sind, und daß in fecD Mutanten unterschiedliche Komponenten ausfallen. Phänotypisch könnte man die einzelnen Mutantentypen nicht unterscheiden, in allen findet keine Induktion der fec Genexpression durch Citrat mehr statt.

Viele der in 4.3. beschriebenen Hypothesen könnten mit Hilfe von Komplementationsstudien überprüft werden. Operatormutationen können z.B. durch die entsprechende Genregion auf dem Plasmid nicht komplementiert werden, während dies für Gene, die für periplasmatische, cytoplasmatische oder Membran-Proteine codieren im heterozygoten Zustand gelingen sollte. Zusätzlich könnte man eine Feinkartierung der fec Genregion durchführen. Durch die Isolierung rekombinanter Plasmide sollten viele der bislang noch offenen Fragen zu beantworten sein.

4.4. Modell für die Regulation des Eisencitrat-Transportsystems bei Escherichia coli K12

Im folgenden wird ein Modell für die Regulation des Fec Systems vorgeschlagen, das im Einklang mit den bis heute erhaltenen Untersuchungsergebnissen steht.
Die Regulation des Systems erfolgt auf der Ebene der Transkription. Die Expression wird bei Anwesenheit von

Eisencitrat im Medium induziert, wobei der Eisendicitrat-Komplex als Induktor anzusehen ist (51). Gleichzeitig erfolgt eine zweite Kontrolle durch das Fur Genprodukt. Bei hohem intrazellulären Eisengehalt wird die Expression der fec Gene reprimiert. Um eine Induktion von außen einzuleiten, braucht der Eisencitratkomplex das FecA Rezeptorprotein in der äußeren Membran. Über dieses gelangt er in den periplasmatischen Raum und tritt dort mit einer weiteren Induktionskomponente (FecD) in Kontakt. Diese gibt dann direkt oder über weitere Zwischenstufen die Information an die DNS weiter. In Abbildung 7 ist das Modell für den Fall der fecB Regulation dargestellt.

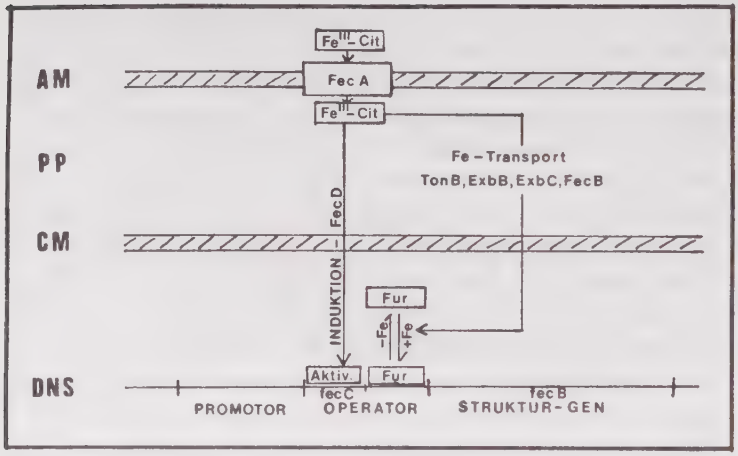


Abb. 7: Modell für das Eisencitrat-Transportsystem und seiner Regulation am Beispiel des fecB Gens.
AM: äußere Membran, PP: Periplasma,
CM: Cytoplasmamembran

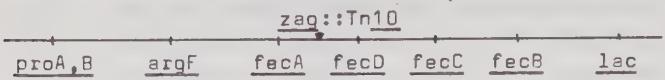
Die Transkription vom Promotor aus kann nur stattfinden, wenn am Operator (fecC) einerseits der Fur Repressor inaktiviert wird und abdissoziiert, andererseits ein Aktivator vorliegt. Das Induktionssystem hat mit dem Transportsystem nur die FecA Komponente gemeinsam. Ein Transport des Eisencitratkomplex durch die Cytoplasmamebran ist für die Induktion nicht notwendig. Die Genprodukte TonB, ExbB, ExbC und FecB sind nur am Transportsystem beteiligt.

Eine Induktion durch den Eisencitratkomplex vom periplasmatischen Raum aus erklärt, wie die Zellen zwischen intrazellulärem und von außen kommendem Citrat unterscheiden können.

Was mit dem Eisencitratkomplex im Periplasma geschieht, ist noch unklar. In früheren Experimenten wurde festgestellt, daß mit osmotischem Schock behandelte Zellen die Fähigkeit verlieren, Eisen über Citrat aufzunehmen (51). Daher müssen Bindeproteine des Periplasmas am Aufnahmemechanismus beteiligt sein. Eine mit der Eisenaufnahme korrelierbare Citrataufnahme konnte nicht gemessen werden (51). Wahrscheinlich dissoziiert der Komplex unter Freisetzung des Eisens an der Cytoplasmamembran. Das Eisen fließt in den Stoffwechsel ein, das Citrat wird vermutlich wieder ins Medium ausgeschieden und steht erneut für den Eisentransport zur Verfügung. Ein Citrat-Transportsystem bzw. eine Verwertung von Citrat als C-Quelle liegt unter aeroben Bedingungen für E.coli nicht vor (66).

4.5. Kartierungsergebnisse und Komplementationsversuche

Aufgrund der in 3.6. erhaltenen Ergebnisse, kann man folgende Reihenfolge der Gene in der fec Genregion postulieren:



Dabei soll hier nur die Reihenfolge der Gene angegeben werden und nicht die Distanz dazwischen.
In Übereinstimmung zu früheren Experimenten (93,101) konnte eine Cotransduktion zwischen fecA und argF festgestellt werden, zwischen fecB und argF dagegen nicht. Aufgrund der Cotransduktionsfrequenz zwischen zag::Tn10 und argF (3.6./VII) und der in 3.6./I bzw. 3.6./II erhaltenen Ergebnisse, muß man die Position des Tn10 zwischen fecA und fecB annehmen. Die früher publizierte Reihenfolge fecA, fecB, zag::Tn10 ist nach den hier erhaltenen Kartierungsergebnissen unwahrscheinlich (52). Die neue Reihenfolge der drei Gene schließt aus, daß fecA und fecB den gleichen Promotor besitzen, da sonst die Tn10-Insertion einen polaren Effekt auf die Transkription eines der beiden Gene ausüben sollte.
Die im Vergleich zu zag::Tn10 niedrigere Cotransduktionsfrequenz von fecA mit argF (vergl. 3.6./VII bzw. 3.6.VIII) kann dadurch erklärt werden, daß bei diesem Experiment auf arg^+ selektiert wurde, wobei sowohl $argI^+$ als auch $argF^+$ Transduktanten isoliert wurden. Für das Gen argI ist aber keine Cotransduktion mit fecA zu erwarten, da es an anderer Stelle im E.coli K12 Chromosom kartiert.
Der Stamm WA380 scheint nach den Ergebnissen von 3.6./II eine Doppelmutation fecA, fecD zu tragen. Aufgrund der mit diesem Stamm erhaltenen Kartierungsergebnisse, muß man die Position von zag::Tn10 zwischen fecA und fecD annehmen, da man ansonsten die isolierten fecD, $fecA^+$ Transduktanten nicht erhalten würde.

Die Position von fecC in unmittelbarer Nähe von fecB ergibt sich aus dessen vermutlicher Funktion als Kontrollregion des fecB Operons. Gleichzeitig wird dadurch die Transkriptionsrichtung von fecB in Richtung der lac Gene festgelegt.

Die Kartierungsergebnisse für Gene in der fec Genregion variieren sehr stark, abhängig von den verwendeten Donoren und Rezipienten. Dies deutet darauf hin, daß der entsprechende Genbereich nicht in allen E.coli K12 Stämmen die gleichen Genabstände aufweist, oder daß die Reihenfolge der Gene unterschiedlich ist. In Abbildung 5 ist eine physikalische Karte des chromosomalen Genbereichs zwischen 5,5 und 9 Min. dargestellt. Die Region zeichnet sich durch ein gehäuftes Auftreten von IS-Elementen aus. Das Vorkommen gleicher IS-Elemente kann zu Inversionen und Deletionen führen (83a) und damit zu einer Lageveränderung der Gene zueinander. Die in 3.7.1. untersuchten F'-Plasmide tragen in keinem Fall die fec Genregion, obwohl man dies aufgrund der enthaltenen chromosomalen Genbereiche zumindest für einige Plasmide erwarten sollte. Die Integration von F-Plasmiden ins Chromosom erfolgt bevorzugt in IS-Elementen. Hfr-Stämme haben ihren Startpunkt häufig in diesen Genbereichen. Bei der Isolierung von F'lac-Plasmiden verwendet man in der Regel Hfr-Stämme, bei denen das F-Plasmid in einem der beiden IS3-Elementen ($\lambda_3\beta_3$ bzw. $\lambda_4\beta_4$) in der lac Genregion integriert ist (vergl. Abb.5). Da IS-Elemente sehr häufig in ihrer unmittelbaren Umgebung Deletionen verursachen, erhält man bei der F'-Isolierung Plasmide mit den unterschiedlichsten chromosomalen Insertionen. Dazu trägt auch das $\gamma\delta$-Element, ein natürlicher Bestandteil des F-Plasmids bei (23). Es verursacht mit großer Häufigkeit Deletionen von chromosomalen Segmenten auf F'-Plasmiden. Die genannten Faktoren könnten eine mögliche Erklärung dafür sein, daß auf keinem der untersuchten Plasmide die fec Genregion nachgewiesen werden konnte.

Die fec Gene kartieren nicht zwischen den beiden IS1-Elementen, die in der Region vorliegen (3.7.2.). Durch P1argFCm-Phagen konnten fec Mutationen nicht komplementiert werden.
Das argF Gen kommt nicht in E.coli W und S.typhimurium vor (50), hier existiert nur das analoge Gen argI. Gleichzeitig fehlt in beiden Stämmen ein Eisencitrat-Transportsystem (107). Heteroduplexuntersuchungen im Elektronenmikroskop und Restrictionsanalysen zeigten, daß die DNS-Bereiche um die Gene argF und argI verschieden sind. Daher vermutet man, daß das argF Gen aus anderen Arten in E.coli K12 gelangte, z.B. durch Übertragung mittels konjugativer Plasmide und Transposition auf das Chromosom. Die Fähigkeit zur Transposition des argF Genbereichs in E.coli K12 wurde bestätigt (106).
Ähnliche Überlegungen könnte man für die fec Genregion anstellen. Aufgrund der vielen in der Region vorliegenden IS-Elemente, könnte der fec Genbereich ebenfalls ein Transposon darstellen, das ursprünglich über konjugative Plasmide in E.coli K12 gelangte. Das Aerobactinsystem beweist, daß Eisentransportsysteme auf konjugativen Pasmiden existieren. Die Präsenz von Eisencitrat-Transportsystemen in anderen Mikroorganismen wurde ebenfalls nachgewiesen (20,76). Alle bisher durchgeführten Versuche, die fec Genregion als Transposon auf konjugative Plasmide zu übertragen, waren erfolglos. Um die Hypothese zu stützen, sollten weitere Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe des Antibiotikums Streptonigrin ließen sich Mutanten im Eisencitrattransportsystem isolieren. Das Antibiotikum ist wahrscheinlich generell für die Isolierung von Eisentransportmutanten zu verwenden.
Mit Hilfe der Genfusionstechnik konnte die Expression des fecB Gens quantitativ untersucht und ein Modell für dessen Regulation aufgestellt werden. Bei Anwesenheit von Eisencitrat im Medium erfolgt eine 10- bis 20-fache Induktion der fecB Genexpression. Dies läßt sich unter anaeroben Bedingungen ebenfalls feststellen, die Gesamtexpression ist hier aber geringer. Eine Mutation im fecA Gen führt zum Ausfall der Induktion. Der FecA Rezeptor stellt somit eine gemeinsame Komponente des Transport- und Induktionssystems dar. Die beiden Genprodukte TonB und ExbB sind nicht am Induktionsprozess beteiligt.
Eine Mutation im ompR, envZ Genbereich bewirkt eine reduzierte fecB Genexpression, die Ursache hierfür ist noch unklar. Es konnten zwei neue Mutantentypen isoliert werden, bei denen die Induktion des fecB Gens durch Citrat fehlt. In fecC Mutanten liegt vermutlich eine defekte Genkontrollregion vor, während in fecD Mutanten eine Komponente des Fec Induktionssystems fehlt. Hierbei könnte es sich um einen cytoplsmatischen Aktivator, ein Transcytoplasmamembranprotein oder ein periplasmatisches Protein handeln. Das Fec System wird zusätzlich zur Citratinduktion durch den intrazellulären Eisengehalt mit Hilfe des Fur Repressors reguliert.
Mit Hilfe von Kartierungsexperimenten wurde die Reihenfolge der Gene in der fec Genregion bei 7 Min. ermittelt.

6. ANHANG

Versuche zur Klonierung der fec Genregion

Aus den im Diskussionsteil genannten Gründen wurden mehrere Versuche unternommen, die fec Genregion auf Plasmid-Vektoren zu klonieren. Unter anderem wurde die direkte Klonierung chromosomaler DNS-Fragmente in das multy copy Plasmid pBR322 versucht. Hierzu wurden die unterschiedlichsten Restrictionsenzyme verwendet, es wurden totale, partielle und Doppel-Restrictionen durchgeführt. Für die Transformation der rekombinanten Plasmide wurden sowohl fecA als auch fecB Mutanten verwendet. Selektiert wurde entweder direkt auf Fec^+ oder zunächst auf einen Resistenzmarker des Plasmids und nachfolgend auf Fec^+. Bei mehreren Versuchen dieser Art konnte keine Transformante erhalten werden, die Citrat zur Eisenaufnahme verwenden konnte. Die Isolierung und Untersuchung der transformierten Plasmide ergab, daß diese je nach Ansatz zu 1 bis 12 % chromosomale Inserts aufwiesen. Statistisch gesehen sollten diese rekombinanten Plasmide das gesamte Chromosom mehrfach enthalten.
Alle Versuche, die fec Genregion durch den Transfer auf konjugative Plasmide anzureichern, hatten ebenfalls keinen Erfolg. Hierfür wurden zwei Verfahren angewandt: die Isolierung von F'-Plasmiden nach Konjugation von Hfr-Stämmen mit recA, fec Mutanten und die Transposition von chromosomalen Genen auf konjugative Plasmide mit Hilfe des Phagen Mu. Im ersten Fall konnten keine F'fec-Plasmide isoliert werden. Im Fall der Mu-Transposition entstanden Plasmide, welche die Insertion Mu-fec-Mu trugen. Diese Plasmide waren aber extrem instabil, so daß es nicht möglich war, damit weiterzuarbeiten.

Da für weitere Experimente eine Klonierung der fec Genregion sehr hilfreich wäre, sollten erneut Versuche in dieser Richtung unternommen werden.
Eine mögliche Ursache für das Scheitern der Klonierung in pBR322 könnte sein, daß durch die starke Überproduktion von klonierten Transportproteinen die Konstitution der Zelle geschwächt wird. Diese Transformanten hätten von vornherein einen Selektionsnachteil. Selbst wenn die fec Gene diesen Effekt nicht zeigten, könnte dies für benachbarte Gene, die gleichzeitig kloniert werden, der Fall sein. Durch Verwendung von Plasmiden mit geringer Kopienzahl, kann man diesen Faktor ausschließen. Hierfür bieten sich auch sog. "run away Plasmide" an, die nur unter bestimmten Temperaturbedingungen in hoher Kopienzahl gebildet werden.
Für die Klonierungsversuche sollte zur Selektion der rekombinanten Plasmide eine fecB Mutante verwendet werden. In diesen Mutanten liegt ein intaktes Induktionssystem vor, so daß eine Expression klonierter fec Gene unmittelbar nach der Transformation optimal stattfinden kann. Wie man aus den Ergebnissen dieser Arbeit schließen kann, sind diese Bedingungen für fecA Mutanten sicher nicht gegeben.
Ein weiterer kritischer Punkt ist die Selektion der Transformanten. Hier sollten neben der direkten Selektion auf Eisencitratverwertung auch indirekte Selektionen versucht werden. Zum Beispiel könnte man auf ein in der gleichen Region vorliegendes Gen selektieren. Hier bietet sich das zag::Tn10 an, das zwischen fecA und fecB kartiert (vergl. 3.6.).
Die Tatsache, daß für die Expression von fecB ein intaktes fecA Gen notwendig ist (vergl. 3.4.3.), kann ebenfalls für eine indirekte Selektion verwendet werden. In fecA, fecB::Mud1(Ap,lac) Doppelmutanten sollte erst nach erfolgreicher Klonierung des fecA Gens eine induzierbare ß-Galactosidaseexpression zu beobachten sein. Sowohl die Selektion als auch die Untersuchung der ß-Galactosidaseexpression könnten gleichzeitig auf Lac-MacConkey-Platten erfolgen.

7. LITERATUR

1. Bachmann, B.J. (1983) Microbiol. Rev. 47, 180-230

2. Bates, G.W., Billops, C., Saltman, P. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2810-2815

3. Berg, D.E. (1977) in A.I.Bukhari, J.A.Shapiro, L. Adhya (eds.) "DNA insertion elements, plasmids and episomes", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp.555-558

4. Bindereif, A., Braun, V., Hantke, K. (1982) J. Bacteriol. 150, 1472-1475

5. Bishop, J.G., Schanbacher, F.L., Ferguson, L.C., Schmith, K.L. (1976) Infect. Immun. 14, 911-918

6. Braun, V. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 335-377

7. Braun, V. (1978) in: R.Y.Stanier, H.J.Rogers, B.J. Wards (eds.) "Relation between Structure and Function in the Prokaryotic Cell", Cambridge University Press, pp.111-138

8. Braun, V. (1983) The Iron Transport Systems of Escherichia coli, in: A.N.Martonosi (ed.) "The Enzymes of Biological Membranes", Plenum Press, New York

9. Braun, V., Burkhardt, R. (1982) J. Bacteriol. 152, 223-231

10. Braun, V., Burkhardt, R., Schneider, R., Zimmermann, L. (1982) J. Bacteriol. 152, 553-559

11. Braun, V., Gross, R., Köster, W., Zimmermann, L. (1983) Mol. Gen. Genet. 192, 131-139

12. Braun, V., Günthner, K., Hantke, K., Zimmermann, L. (1983) J. Bacteriol. 156, 302-315

13. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A. (1976) J. Supramol. Struct. 5, 37-58

14. Braun, V., Hantke, K. (1977) Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems, in: J.L.Reissig (ed.) "Microbial Interactions, Receptors and Recognition, Series B", Vol.3, Chapman and Hall, London, pp.101-130

15. Braun, V., Hantke, K. (1981) Bacterial cell surface receptors, in: B.K.Ghosh (ed.) "Organization of procaryotic cell membranes", Vol.II, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-74

16. Braun, V., Hantke, K. (1982) Receptor-dependent transport systems in Escherichia coli for iron complexes and vitamin B12, in A.N.Martonosi (ed.) "Membrane and Transport", Vol.2, Plenum Press, New York and London, pp. 107-113

17. Braun, V., Schaller, K., Wolff, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 323, 87-97

18. Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4530-4533

19. Collins, J., Pritchard, R.H. (1973) J. Mol. Biol. 78, 143-155

20. Cox, C.D. (1980) J. Bacteriol. 142, 581-587

21. De Martini, M., Inouye, M. (1978) J. Bacteriol. 133, 329-335

22. Deonier, R.C., Davidson, N. (1976) J. Mol. Biol. 107, 207-222

23. Deonier, R.C., Yun, K., Kuppermann, M. (1983) Molec. Gen. Genet. 190, 42-50

24. Dietz, G.W.T. (1976) in: Adv. Enzymol. (ed. A.Meister) 44, 237-259

25. Ernst, J.F., Bennett, R.L., Rothfield, L.I. (1978) J. Bacteriol. 135, 928-934

26. Fecker, L., Braun, V. (1983) J. Bacteriol.

27. Friedberg, I. (1972) J. Bacteriol. 112, 1201-1205

28. Frost, G.E., Rosenberg, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 330, 90-101

29. Goldenbaum, P.E., Farmer, K.S. (1980) J. Bacteriol. 142, 347-349

30. Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 209-218

31. Hadley, R.G., Hu, M., Timmons, M., Yon, K., Deonier, R.C. (1983) Gene 22, 281-287

32. Hall, M.N., Silhavy, T.J. (1981) J. Mol. Biol. 146, 23-43

33. Hall, M.N., Silhavy, T.J. (1981) J. Mol. Biol. 151, 1-15

34. Hall, B.G. (1982) J. Bacteriol. 151, 269-273

35. Hancock, R.E.W., Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 125, 409-415

36. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1977) Arch. Microbiol. 114, 231-239

37. Hantke, K. (1978) Molec. Gen. Genet. 164, 131-135

38. Hantke, K. (1981) Molec. Gen. Genet. 182, 288-292

39. Hantke, K. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 15, 83-86

40. Hantke, K. (1983) Molec. Gen. Genet. 191, 301-306

41. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 49, 301-305

42. Hantke, K., Braun, V. (1978) J. Bacteriol. 135, 190-197

43. Hantke, K., Zimmermann, L. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12, 31-35

44. Harley, J.B., Fetterolf, C.J., Bello, C.A., Flaks, J.G. (1982) Can. J. Microbiol. 28, 545-552

45. Hartmann, A. (1980) Dissertation, Universität Tübingen

46. Hartmann, A., Braun, V. (19807 J. Bacteriol. 143, 246-255

47. Hartmann, A., Fiedler, H.-P., Braun, V. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 517-524

48. Hassan, H.M., Fridovich, I. (1977) J. Bacteriol. 129, 1574-1583

49. Heppel, L.A. (1971) in: L.I.Rothfield (ed.) "Structure and Function of Biological Membranes", Academic Press, New York, pp. 223-247

50. Hu, M., Deonier, R.C. (1981) Mol. Gen. Genet. 181, 222-229

51. Hussein, S. (1980) Dissertation, Universität Tübingen

52. Hussein, S., Hantke, K., Braun, V. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 431-437

53. Ichihara, S., Mizushima, S. (1978) J. Biochem. 83, 137-140

54. Imai, K., Jijima, T., Hasegawa, T. (1973) J. Bacteriol. 114, 961-965

55. Ishiguro, N., Hirose, K., Asagi, M., Sato, G. (1981) J. Gen. Microbiol. 123, 193-196

56. Ishiguro, N., Oka, C., Sato, G. (1978) Appl. Environ. Microbiol. 36, 217-222

57. Ishiguro, N., Oka, C., Hanazawa, Y., Sato, G. (1979) Appl. Environ. Microbiol. 38, 956-964

58. Jacob, F., Monod, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 318-356

59. Jost, F.J.(Jr.), Fridovich, I. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 161, 395-401

60. Kaback, H.R. (1973) in: L.Leive (ed.) "Bacterial Membrane and Walls", Marcel Dekker Inc., New York, pp. 241-292

61. Kadner, R.J., Heller, K., Coulton, J.W., Braun, V. (1980) J. Bacteriol. 143, 256-264

62. Kay, W.W., Cameron, M. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 190, 270-280

63. Kleckner, N., Roth, J.R., Botstein, D. (1977) J. Mol. Biol. 116, 125-159

64. Konisky, J. (1978) in: L.N.Ornston, J.R.Sokatch (eds.) "The Bacteria", Vol.6, Bacterial Diversity, Academic Press, Inc., New York

65. Konisky, J. (1979) in: M.Inoye (ed.) "Bacterial Outer Membranes: Biogenesis and Function", John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 319-359

66. Koser, S.A. (1923) J. Bacteriol. 8, 493-520

67. Lara, F.J.S., Stokes, J.L. (1952) J. Bacteriol. 63, 415-420

68. Luckey, M., Pollack, J.R., Wayne, R., Ames, B.N., Neilands, J.B. (1972) J. Bacteriol. 111, 731-738

69. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., van Alphen, L. (1975) FEBS Lett. 58, 254-258

70. Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H., Berendsen, W. (1976) Molec. Gen. Genet. 147, 251-261

71. Lundrigan, M., Earhart, C.F. (1981) J. Bacteriol. 146, 804-807

72. Lutgens, M., Gottschalk, G. (1980) J. Gen. Microbiol. 119, 63-70

73. Martonosi, A.N. (ed.) (1982) "Membranes and Transport", Plenum Press, New York, London

74. Mc Cord, J.M., Day, E.D.(Jr.) (1978) FEBS Lett. 86, 139-142

75. Mc Intosh, M.A., Chenault, S.S., Earhart, C.F. (1979) J. Bacteriol. 137, 653-657

76. Messenger, A.J.M., Ratledge, C. (1982) J. Bacteriol. 149, 131-135

77. Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

78. Mizuno, T., Wurtzel, E.T., Inouye, M. (1982) J. Bacteriol. 150, 1462-1466

79. Nikaido, H., Nakae, T. (1979) in: A.H.Rose, J.G. Morris (eds.) "Advances in Microbial Physiology", Vol. 20, Academic Press, London, pp. 163-250

80. Nossal, N.G., Heppel, L.A. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3055-3062

81. Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., Jann, K. (1977) Bacteriol. Rev. 41, 667-710

82. Pierce, J.R., Pickett, C.L., Earhart, C.F. (1983) J. Bacteriol. 155, 330-336

83. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) J. Bacteriol. 127, 218-228

83a. Reif, H.J., Saedler, H. (1975) Molec. Gen. Genet. 137, 17-28

84. Reuser, A.J.J., Postma, P.W. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 584-592

85. Rosen, H., Seymour, J.K. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 208, 512-519

86. Schaller, K., Dreher, R., Braun, V. (1981) J. Bacteriol. 146, 54-63

87. Schneider, R., Hartmann, A., Braun, V. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11, 115-119

88. Schweizer, M., Henning, U. (1977) J. Bacteriol. 129, 1651-1652

89. Shattuck-Eidens, D.M., Kadner, R.J. (1981)
J. Bacteriol. 148, 203-209

90. Shattuck-Eidens, D.M., Kadner, R.J. (1983)
J. Bacteriol. 155, 1062-1070

91. Taylor, R.K., Hall, M.N., Enquist, L., Silhavy, T.J.
(1981) J. Bacteriol. 147, 255-258

92. Toussaint, A., Desmet, L., van Gijsegem, F., Faelen, M.
(1981) Molec. Gen. Genet. 181, 201-206

93. Wagegg, W. (1980) Dissertation, Universität Tübingen

94. Wagegg, W., Braun, V. (1981) J. Bacteriol. 145,
156-163

95. Wang, C.C., Newton, A. (1969) J. Bacteriol. 98,
1135-1141

96. Wanner, B.L., Sarthy, A., Beckwith, J. (1979)
J. Bacteriol. 140, 229-239

97. Weinberg, E.D. (1978) Microbiol. Rev. 42, 45-66

98. White, J.R., Yeowell, H.N. (1982) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 106, 407-411

99. Winkler, H.H. (1970) J. Bacteriol. 101, 470-475

100. Winkler, H.H. (1971) J. Bacteriol. 107, 74-78

101. Woodrow, G.C., Langman, L., Young, I.G., Gibson, F.
(1978) J. Bacteriol. 133, 1524-1526

102. Wookey, P., Hussein, S., Braun, V. (1981)
J. Bacteriol. 146, 1158-1161

103. Wookey, P., Rosenberg, H. (1978) J. Bacteriol. 133, 661-666

104. Worsham, P.L., Konisky, J. (1981) J. Bacteriol. 145, 647-650

105. Yeowell, H.N., White, J.R. (1982) Antimicr. Ag. Chemother. 22, 961-968

106. York, M.K., Stodolsky, M. (1981) Molec. Gen. Genet. 181, 230-240

107. Young, I.G., Cox, G.B., Gibson, F. (1967) Biochim. Biophys. Acta 141, 319-331

LEBENSLAUF

Luitgard Zimmermann
geboren am 11. Oktober 1956
in Bensheim

1962 - 1966	Besuch der Volksschule in Bensheim
1966 - 1975	Besuch des Gymnasiums in Bensheim
3. Juni 1975	Abitur
ab WS 1975/76	Studium der Biologie, Diplom an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
24. Oktober 1977	Diplomvorprüfung in Biologie
18. Dezember 1980	Diplomhauptprüfung in Biologie, Hauptfach Mikrobiologie. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Universität Tübingen mit dem Titel: Genfusionen zur Analyse Rezeptorabhängiger Transport-Prozesse bei Escherichia coli K12
Januar 1981 bis Dezember 1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun und Privatdozent Dr. K. Hantke

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Altendorf, D. Ammermann, C.F. Bardele, F.W. Bentrup, W.U. Berthold, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, W. Frey, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.P. Hadeler, A. Hager, K. Hantke, V. Hemleben, W. Löffler, D. Mecke, H. Meier, C. Meier-Brook, F. Möhres, F. Oberwinkler, C. Pelling, H. Probst, A. Rieker, E. Sander, E. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, P. Wenk, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.